



**HUGO RICARDO  
VIEGAS GOMES DA  
COSTA**

**ANÁLISE DE PRODUTOS DE NUTRIÇÃO INFANTIL  
POR FLUORESCÊNCIA DE RX**







**HUGO RICARDO  
VIEGAS GOMES DA  
COSTA**

**ANÁLISE DE PRODUTOS DE NUTRIÇÃO INFANTIL  
POR FLUORESCÊNCIA DE RX**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, realizada sob a orientação científica da Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo, Professora associada com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e co-orientação do Engenheiro João Lopes Borges, chefe do Departamento de Qualidade da Fábrica da Nestlé de Avanca.



Dedico este trabalho ao meu tio Francisco Alberto.



**o júri**  
presidente

**Prof. Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva**  
Investigador auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Prof. Doutor João António Baptista Pereira de Oliveira**  
Professor associado do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Profª. Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo**  
Professora associada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Engenheiro João Lopes Borges**  
Chefe de Controlo de Qualidade da Fábrica da Nestlé de Avanca





## **agradecimentos**

Agradeço aos meus pais, pelo seu trabalho diário e por continuarem a apoiar-me.

À Joana, pela sua dedicação impar, compreensão e companhia.

Ao Engenheiro João Borges pela oportunidade que me concedeu para demonstrar o meu valor e pela sua disponibilidade total e apoio essencial.

À Doutora Ivonne Delgadillo pela sua simpatia e ensinamentos preciosos.

Ao Vitor e à Fátima pelo seu companheirismo e boa disposição.

Aos restantes elementos do Departamento de Qualidade da Nestlé que sempre me trataram de forma calorosa.



## palavras-chave

Absorção Atômica, Fluorescência de Raio-X, Produtos de Nutrição Infantil.

## resumo

A criação de fórmulas de nutrição infantil para recém-nascidos e crianças até à idade pré-escolar tem que ter em conta a suas necessidades nutricionais durante todo o seu percurso de crescimento e desenvolvimento físico e mental. Para proporcionar um produto nutricionalmente equilibrado são adicionadas vitaminas e minerais, entre os quais o cálcio e ferro, nas formas de Carbonato de Cálcio e Fumarato Ferroso.

O controlo destes minerais torna-se importante, pois dá-nos a garantia de que o produto sai para o mercado de acordo com as especificações, estando certos que o seu consumo não irá trazer nenhum perigo para a saúde humana. O uso do aparelho de fluorescência por Raio-X, PANanalytical Minipal 4, é uma técnica de análise alternativa à Absorção Atômica, que pode ser usado na linha de produção.

Para dar uma resposta adequada, fiável e precisa tem que se proceder à implementação de um modelo de calibração em que as duas variáveis estejam altamente correlacionadas. Posteriormente faz-se a validação, para verificar se tem boa performance e se ajusta ao que se pretende. Ao longo do processo produtivo torna-se ainda necessário monitorizar o método de calibração para assegurar que o processo produtivo está controlado, que a modelo de calibração ainda é válido para a análise rotineira dos produtos que estão a ser produzidos e que o aparelho XRF continua a operar nas melhores condições.

Para atingir os objectivos propostos, foram analisadas por absorção atômica 471 amostras de um conjunto de produtos de Nutrição Infantil. Visto a técnica de Fluorescência de Raio-X ser sensível para alterações na composição e morfologia das amostras, estas foram divididas por grupos de acordo com as suas características e a partir daí construíram-se três modelos de calibração. Para aumentar a gama de concentração e melhorar a robustez, foram criadas amostras especiais, com diferentes teores de cálcio e ferro.

Os modelos criados mostraram um bom comportamento na análise de cálcio e ferro de todos os produtos de produção. As condições implementadas no aparelho de XRF são adequadas para a análise de quase todos os produtos, excepção feita ao produto Farinha não Láctea com Cacau, que é de difícil manipulação e que demonstrou sempre uma diferença permanente e uma maior variabilidade para o cálcio. Serão necessários estudos à matriz deste produto e a implementação de uma condição específica para o doseamento desse mineral.



## **keywords**

Atomic Absorption, X-Ray Fluorescence, Infant Cereals.

## **abstract**

The creation of infant formulas for newborns and children up to preschool age have to take into account their nutritional needs throughout their journey of growth and mental development. To provide a nutritionally balanced product, vitamins and minerals, like calcium and Iron are added, in the form of Calcium Carbonate and Ferrous Fumarate.

The control of these minerals becomes important because it gives us the assurance that the product goes to market in accordance with his specifications, being certain that their consumption will not bring any danger to human health. The use of a X-ray Fluorescence spectrometer, like the PANalytical Minipal 4 is an alternative analysis technique to the atomic absorption, which can be used in the production line.

To respond adequately, reliably and accurately, it has to proceed with the implementation of a calibration model, in which the two variables are highly correlated, and subsequently to its validation, to check if it has a good performance according to the needs.

Throughout the production process is even necessary to monitor the calibration method, to ensure that the production process is controlled, that the calibration model is still valid for the routine analysis of products being manufactured and that the XRF instrument continues to operate under the best conditions.

To achieve the proposed objectives, 471 samples of a product set of infant nutrition formula were analyzed by atomic absorption. Since the technique of X-ray fluorescence is sensitive to changes in the composition and morphology of the samples, they were divided into groups according to their characteristics and from there we built three models of calibration. To increase the range of concentration and improve the robustness, special samples with different levels of calcium and iron were created. The models created for the analysis of calcium and iron showed a good behavior in all products. Conditions implemented in the XRF equipment were suitable for XRF analysis of almost all products, apart from the non-dairy product with Cocoa, which is difficult to handle and has always shown a permanent difference and greater variability for calcium. Studies are needed for this kind of product and implementation of a specific condition for the determination of this mineral.



# ABREVIATURAS USADAS

(v/v)	Porcentagem em volume
A	Ampère, Unidade SI de Intensidade de Corrente Eléctrica
AAS	Absorção Atómica
Alt.	Método Alternativo
Bias	Diferença
C <sub>4</sub> H <sub>2</sub> FeO <sub>4</sub>	Fumarato Ferroso
Ca <sup>2+</sup>	Ião Cálcio
CaCO <sub>3</sub>	Carbonato de Cálcio
cps	Feixes por segundo
CUSUM	Soma dos desvios permanentes acumulados
CV	Coeficiente de variação
CV(r)	Coeficiente de variação da repetibilidade
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EFSA	Agencia Europeia da Segurança Alimentar
Fe <sup>2+</sup>	Forma Ferrosa
Fe <sup>3+</sup>	Forma Férrica
KeV	Quiloelectrovolt, energia dos electrões do aparelho
LCL	Limite de controlo inferior
mg	miligrama
NRC	Nestlé Research Centre
R <sup>2</sup>	Coeficiente de determinação
Ref.	Método de referência
RSD(r)	Desvio padrão relativo de repetibilidade (%)
RX	Raio-X
SD	Desvio padrão
SD(d)	Desvio Padrão das Diferenças
SD(iR)	Desvio padrão de reprodutibilidade intermédia
SD(r)	Desvio padrão de repetibilidade
SDD	Detector de Silício
SEC	Erro Padrão de Calibração
SEP	Erro Padrão de Previsão
SI	Unidade de Medida do Sistema Internacional
SCF	Comité Científico para Alimentação
UCL	Limite de controlo superior
V	Volt, unidade SI para Voltagem
W	Watt, unidade SI para Potência
XRF	Fluorescência de Raio-X





# ÍNDICE

## OBJECTIVO

<b>CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1. FORTIFICAÇÃO DE ALIMENTOS COM CÁLCIO	2
1.2. FORTIFICAÇÃO DE ALIMENTOS COM FERRO	4
1.3. ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO ATÓMICA COM CHAMA	8
1.3.1 CONSTITUIÇÃO DO APARELHO DE ABSORÇÃO ATÓMICA	8
1.3.2 FUNCIONAMENTO DO MONOCROMADOR E DO DETECTOR	10
1.4. ESPECTROSCOPIA DE RAIOS-X	12
1.4.1 PROCESSO BÁSICO DE PRODUÇÃO DOS RAIOS-X	12
1.4.2. O APARELHO DE XRF	13
O Tubo de Raio-X	13
Espectro Contínuo de Radiação	15
Filtros do Tubo	16
Amostra	16
Colimador	18
Detector	18
<b>CAPÍTULO 2 - CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ALTERNATIVO</b>	<b>21</b>
2.1. CALIBRAÇÃO DO MÉTODO	21
2.1.1. PRINCÍPIOS DA CALIBRAÇÃO	21
2.1.2. PROCESSAMENTO ESTATÍSTICO DOS RESULTADOS DE CALIBRAÇÃO	24
2.2. VALIDAÇÃO DO MÉTODO	26
2.2.1. PRINCÍPIOS DA VALIDAÇÃO	26
2.2.2. PROCESSAMENTO ESTATÍSTICO DOS RESULTADOS DE VALIDAÇÃO	28
2.3. MONITORIZAÇÃO DO MÉTODO	28
2.3.1. PRINCÍPIOS DA MONITORIZAÇÃO	28
2.3.2. PROCESSAMENTO ESTATÍSTICO DO APARELHO MINIPAL E DA CALIBRAÇÃO	29
2.3.3. MONITORIZAÇÃO DO APARELHO XRF	29
2.3.4. MONITORIZAÇÃO DA CALIBRAÇÃO	30

<b>CAPÍTULO 3 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b>	<b>34</b>
3.1. MÉTODO DE REFERÊNCIA – ABSORÇÃO ATÓMICA	34
3.1.1. PROCEDIMENTO DE PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS ESPECIAIS	35
3.1.2. PROTOCOLO DE ABSORÇÃO ATÓMICA	37
3.1.3. DOSEAMENTO DE CÁLCIO E FERRO POR ABSORÇÃO ATÓMICA	42
3.1.4. CÁLCULO DA QUANTIDADE DE FERRO E CÁLCIO EM mg/100g	46
3.1.5. RESULTADOS DE CONCENTRAÇÃO DE AMOSTRAS ESPECIAIS	47
3.2. MÉTODO ALTERNATIVO – DOSEAMENTO USANDO O EQUIPAMENTO DE XRF	49
3.2.1. OPTIMIZAÇÃO DO APARELHO DE XRF	49
3.2.2. PROTOCOLO PARA DOSEAMENTO DE CÁLCIO E FERRO	51
3.2.3. RESULTADOS DE CALIBRAÇÃO	55
Processamento Estatístico no Programa Q-Stat	62
3.2.4. RESULTADOS DE VALIDAÇÃO	63
Processamento Estatístico no Programa Q-Stat	70
<b>CAPÍTULO 4 - MONITORIZAÇÃO DO MÉTODO</b>	<b>74</b>
4.1. MONITORIZAÇÃO DO MODELO 1 DE CALIBRAÇÃO	74
4.1.1. AMOSTRAS DIÁRIAS ANALISADAS PELO MÉTODO DE REFERÊNCIA E MÉTODO ALTERNATIVO	74
4.1.2. CARTAS DE CONTROLO	77
4.2. MONITORIZAÇÃO DO APARELHO DE XRF	80
4.2.1. AMOSTRAS ESCOLHIDAS PARA MONITORIZAÇÃO DO MODELO DE CALIBRAÇÃO 1	80
4.2.2. RESULTADOS DE MONITORIZAÇÃO DO APARELHO DE XRF	81
4.2.3. CARTAS DE CONTROLO DA MONITORIZAÇÃO DO APARELHO DE XRF	83
<b>CAPÍTULO 5 - DISCUSSÃO DOS RESULTADOS</b>	<b>86</b>
<b>CAPÍTULO 6 - CONCLUSÃO</b>	<b>94</b>
BIBLIOGRAFIA	96
ANEXOS	101

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 - Transições de energia. ....	8
Fig. 2 - Imagem do Espectrofotómetro existente no laboratório Físico-Químico da Fábrica de Avanca.....	8
Fig. 3 - Esquema do nebulizador e do queimador.....	9
Fig. 4 - Esquema simplificado de Absorção atómica. ....	10
Fig. 5 - Espectro electromagnético.....	12
Fig. 6 - Transições electrónicas existentes num átomo. ....	13
Fig. 7 - Fonte de Raios-X .....	14
Fig. 8 - Formação de raios-X .....	14
Fig. 9 - Radiação característica e radiação contínua. ....	15
Fig. 10 - Dispersão das ondas numa amostra. ....	17
Fig. 11 - Esquema do percurso dos electrões no detector.....	18
Fig. 12 - Detector SDD (Silicon Drift Detector) .....	19
Fig. 13 - Passos essenciais envolvidos na calibração do método.....	22
Fig. 14 - Modo de verificar a presença de uma diferença sistemática. ....	27
Fig. 15 - Modo de verificar a presença de uma diferença proporcional. ....	27
Fig. 16 - Limites de controlo de uma carta de controlo simples. ....	29
Fig. 17 - Limites CUSUM .....	30
Fig. 18 – Comportamento ideal para as amostras de uma carta de controlo. ....	31
Fig. 19 - Processo de compressão da amostra no conjunto.....	51
Fig. 20 - Prensa Hidráulica Automática. ....	52
Fig. 21 - Procedimento para retirar a pastilha do conjunto da prensa. ....	52
Fig. 22 - Aparelho de espectroscopia por raio-X Minipal 4.....	53
Fig. 23 - Janela do Programa Minipal/Minimate, onde se definem as condições da aplicação. ....	53
Fig. 24 – Veracidade do cálcio de amostras diárias de Farinha Láctea com frutos. ....	76
Fig. 25 – Veracidade do ferro de amostras diárias de Farinha Láctea com frutos. ....	76
Fig. 26 – Repetibilidade para o cálcio, do método alternativo e do método de referência.....	76
Fig. 27 – Repetibilidade do Modelo 1 para o ferro, do método alternativo e do método de referência.....	77
Fig. 28 - Veracidade do cálcio de amostras diárias de Farinha Láctea simples. ....	77
Fig. 29 – Veracidade do ferro de amostras diárias de Farinha Láctea com frutos. ....	78

Fig. 30 – Repetibilidade para o cálcio, do método alternativo e do método de referência.....	78
Fig. 31 – Repetibilidade do Modelo 1 para o ferro, do método alternativo e do método de referência.....	78
Fig. 32 – Carta de controlo da veracidade do cálcio, nível baixo. ....	82
Fig. 33 – Carta de controlo da veracidade do ferro, nível baixo. ....	82
Fig. 34 – Repetibilidade para o cálcio, nível baixo e do ferro, nível baixo. ....	83
Fig. 35 - Carta de controlo da veracidade do cálcio, nível alto. ....	83
Fig. 36 – Carta de controlo da veracidade do ferro, nível alto.....	84
Fig. 37 – Repetibilidade para o cálcio, nível alto e do ferro, nível alto. ....	84

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Características-chave dos compostos de ferro usados frequentemente na fortificação de alimentos: solubilidade, biodisponibilidade e custo. ....	5
Tabela 2 - Condições ajustadas no espectrofotómetro com chama.....	9
Tabela 3 - Cálculo do desvio padrão da repetibilidade .....	25
Tabela 4 - Fórmulas de cálculo do desvio padrão da reprodutibilidade (intermédia).....	25
Tabela 5 - Quantidades necessárias, em gramas, para produzir um produto de acordo com a especificação.....	34
Tabela 6 - Quantidades de carbonato de cálcio e fumarato ferroso adicionadas para a formação de cada amostra especial.....	35
Tabela 7 - Programa usado na digestão das amostras.....	39
Tabela 8 - Condições do programa do integrador .....	41
Tabela 9 - Resultados de concentração para a farinha Láctea Simples. ....	46
Tabela 10 - Resultados de concentração para a Farinha Láctea com Frutos... 46	
Tabela 11- Resultados de concentração para a Farinha não Láctea Simples. . 47	
Tabela 12 - Resultados de concentração para a Farinha Láctea com Frutos... 47	
Tabela 13 - Resultados da concentração para a Farinha não Láctea com Mel.47	
Tabela 14 - Resultados para a Farinha não Láctea com Cacau. ....	47
Tabela 15 - Elementos analisados de acordo com a condição escolhida. ....	48
Tabela 16 - Condição segundo a instrução laboratorial da Nestlé. ....	49
Tabela 17 - Melhores Condições Obtidas.....	49
Tabela 18 - Condições implementadas para doseamento de cálcio e ferro....	50
Tabela 19 - Parâmetros da condição <K-Zn>.....	50
Tabela 20 - Média dos Desvios padrões relativos obtido para cada modelo. .	54

Tabela 21 - Curva de calibração do Ferro do Modelo 1. ....	55
Tabela 22 - Curva de calibração do Cálcio, do Modelo 1. ....	56
Tabela 23 - Curva de calibração do Ferro do Modelo 2. ....	57
Tabela 24 - Curva de calibração do Cálcio do Modelo 2 ....	58
Tabela 25 - Curva de calibração do Ferro do Modelo 3. ....	59
Tabela 26 - Curva de calibração do Cálcio do Modelo 3. ....	60
Tabela 27 - Resultados de Linearidade do Programa Q-Stat, para o Modelo 1. .....	61
Tabela 28 - Resultados de Linearidade do Programa Q-Stat, para o Modelo 2. .....	61
Tabela 29 - Resultados de Linearidade do Programa Q-Stat, para o Modelo 3. .....	61
Tabela 30 - Média do Desvio padrão Relativo (%) das curvas de validação ....	62
Tabela 31 - Curva de validação do ferro, do Modelo 1 ....	63
Tabela 32 - Curva de validação do cálcio, do Modelo 1.....	64
Tabela 33 - Curva de validação do ferro, do Modelo 2 ....	65
Tabela 34 - Curva de validação do cálcio, do Modelo 2.....	66
Tabela 35 - Curva de validação do ferro, do Modelo 3 ....	67
Tabela 36 - Curva de validação do cálcio, do Modelo 3.....	68
Tabela 37 - Resultados de Precisão do Programa Q-Stat, para o Modelo 1....	69
Tabela 38 - Resultados de Precisão do Programa Q-Stat, para o Modelo 2....	69
Tabela 39 - Resultados de Precisão do Programa Q-Stat, para o Modelo 3....	69
Tabela 40 - Avaliação da diferença sistemática para o Modelo 1.....	69
Tabela 41 - Avaliação da diferença sistemática para o Modelo 2.....	70
Tabela 42 - Avaliação da diferença sistemática para o Modelo 3.....	70
Tabela 43 - Avaliação da diferença proporcional para o Modelo 1 ....	70
Tabela 44 - Avaliação da diferença proporcional para o Modelo 2 ....	70
Tabela 45 - Avaliação da diferença proporcional para o Modelo 3 ....	70
Tabela 46 - Resultados da medida da incerteza para o Modelo 1 ....	71
Tabela 47 - Resultados da medida da incerteza para o Modelo 2.....	71
Tabela 48 - Resultados da medida da incerteza para o Modelo 3.....	71
Tabela 49 – Resultados de cálcio da farinha láctea com frutos. ....	73
Tabela 50 – Resultados de ferro da farinha láctea com frutos. ....	74
Tabela 51 – Resultados de cálcio da farinha láctea simples. ....	74
Tabela 52 – Resultados de ferro da farinha Láctea simples.....	75
Tabela 53 – Valores de desvio padrão obtidos .....	75
Tabela 54 -Valores calculados no Q-Stat para os Limites de Controlo e Limites de Perigo.....	77

Tabela 55 -Valores calculados no Q-Stat para os Limites de Controlo e Limites de Perigo.....	79
Tabela 56 – Amostras de monitorização do Modelo 1 .....	79
Tabela 57 - Resultados de ferro, nível baixo, da amostra de C5F_9181_10:00. .....	80
Tabela 58 - Resultados de cálcio, nível baixo, da amostra de C5F_9181_10:00. .....	80
Tabela 59 - Resultados de ferro, nível alto, da amostra de CS_0127_02:14. .	80
Tabela 60 - Resultados de cálcio, nível alto, da amostra de CS_0127_02:14.	81
Tabela 61 -Valores calculados no Q-Stat para os Limites de Controlo e Limites de Perigo.....	83
Tabela 62 -Valores calculados no Q-Stat para os Limites de Controlo e Limites de Perigo.....	84
Tabela 63 - Coeficientes de determinação de todos os modelos de Calibração. .....	86
Tabela 64 - Verificação do intervalo de confiança da calibração.....	87
Tabela 65 – Gama relativa de validação para o método alternativo .....	88
Tabela 66 - Análise do intervalo de confiança da validação. ....	89
Tabela 67 - Coeficientes de determinação das curvas de validação.....	90
Tabela 68 – Desvio padrão relativo e Limite de Repetibilidade das amostras de validação.....	90
Tabela 69 - Resultados de referência para o Grupo 1, obtidos por Absorção Atómica.....	101
Tabela 70 - Resultados de referência para o Grupo 2, obtidos por Absorção Atómica.....	105
Tabela 71 - Resultados de referência para o Grupo 3, obtidos por Absorção Atómica.....	107
Tabela 72 - Média do desvio padrão e do Desvio padrão relativo das amostras de referência.....	110

# OBJECTIVO

O objectivo principal é a criação de um modelo de Calibração de um aparelho de fluorescência por raio-X (XRF), para o doseamento de Cálcio e Ferro de produtos de nutrição infantil (lácteos e não lácteos), em linha de produção. Este modelo vai ser também validado e controlado (monitorizado) usando o programa estatístico *Ester/QStat.Net*, versão 4.4.7.816.

O objectivo secundário é prestar apoio diário no controlo de outros métodos alternativos (NIR, Termobalanças e Refractómetros) de modo a garantir o seu correcto funcionamento e calibração, participar nas actividades diárias do controlo de qualidade e ter um conhecimento de todas as análises de rotina do Laboratório Físico-Químico.

O meu estágio em ambiente empresarial resulta de um protocolo de cooperação entre a Universidade de Aveiro e a Unidade de Fabricação da Nestlé Portugal, sediada em Avanca.





# CAPÍTULO 1

## INTRODUÇÃO

Devido ao controlo apertado em termos de legislação alimentar e também à maior necessidade de proporcionar às pessoas produtos de valor nutricional acrescido começou a haver uma maior necessidade em controlar os produtos que saem para o mercado.

A criação de fórmulas de nutrição infantil, sendo destinada a recém-nascidos e crianças até à idade pré-escolar devem satisfazer todas as suas necessidades nutricionais durante todo o seu percurso de crescimento e desenvolvimento físico e mental. A quantidade de nutrientes essenciais e micronutrientes adicionados e a composição do produto tem que estar de acordo com a legislação comunitária, nomeadamente com a directiva 2006/125/EC de 5 de Dezembro de 2006 (entre outras) e segue também orientações da Organização Mundial de Saúde e da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação. A adição de nutrientes é uma ferramenta útil e segura de melhorar a ingestão de nutrientes. Na determinação dos limites para as vitaminas e minerais na legislação são tidos em conta a avaliação dos riscos incluídos em dados científicos [1] e a opinião científica do Comité Científico para Alimentação (SCF) e da Agencia Europeia da Segurança Alimentar (EFSA), que dão um parecer sobre os limites mínimos e máximos toleráveis de nutrientes que podem ser adicionados [2]. A dose diária recomendada é determinada tendo por base o conceito de nutrição óptima de forma a prevenir deficiências, otimizar as reservas de nutrientes e reduzir a incidência de doenças. Para cada grupo de população, é estabelecido uma necessidade média mais dois desvios padrão desse valor.

O controlo dos nutrientes na fórmula é acompanhado pelo controlo da qualidade em todas as fases da cadeia de produção. É necessário assegurar que o produto que sai para o mercado está de acordo com as especificações, pois só assim nos podemos comprometer que o seu consumo não irá trazer consequências para a saúde. O que se pretende é um produto nutricionalmente equilibrado, de fácil digestão e saboroso.

Nos estados membros da comunidade europeia as vitaminas, os minerais e outros compostos, como por exemplo aminoácidos e substâncias contendo nitrogénio [3], são adicionados voluntariamente durante a produção dos alimentos. Estes compostos têm que ser considerados essenciais (encontrados nos alimentos que fazem parte da dieta) o que não quer dizer que sejam necessários [4]. São adicionados com o intuito de dar uma contribuição positiva ao produto e não para polir a imagem do alimento com baixo teor de nutrientes, e também para uniformizar o conteúdo dos nutrientes, para repor os nutrientes perdidos durante o processamento [5,6] ou ainda fornecer ingredientes-chave aos alimentos, em substituição dos produtos tradicionais, aumentando dessa forma a gama de produtos ricos em nutrientes essenciais [7]. No entanto as autoridades têm que estar alerta de forma a assegurarem que a soma da potencial ingestão de todas as fontes de nutrientes não ultrapassa a dose máxima

recomendada. Por outro lado, a quantidade de vitaminas e minerais usadas como suplementos alimentares ou adicionadas nos alimentos, deve resultar num valor acima do valor mínimo, de outra forma não trará nenhum benefício para quem o consome [2].

Mais de 60 minerais podem ser identificados nos alimentos, presentes em sais inorgânicos ou orgânicos ou combinados com material orgânico. Alguns existem em grandes quantidades, como é o caso do potássio, sódio, cálcio, magnésio, cloro, sulfato, fosfato e bicarbonato. Outros são apenas vestigiais, presentes em quantidades abaixo de 50 ppm, como é o caso do Ferro, Cobre, Iodo, Magnésio, Zinco, Crómio, Níquel, Silício, Flúor, Molibdénio e Selénio, entre outros [8]. A nível da comunidade europeia foram impostas regras para a adição de minerais e vitaminas [3].

A escolha do suplemento mais indicado para ser adicionado a um determinado produto depende das suas características, nomeadamente a sua biodisponibilidade (disponíveis para serem usados pelo nosso organismo), solubilidade e preço. Porém, os compostos que têm uma maior biodisponibilidade costumam ser também aqueles que interagem mais com constituintes dos alimentos e que levam a modificações organolépticas indesejadas, como rancidez (oxidação dos lípidos insaturados), na cor (coloração azulada nas farinhas) e na textura. [9]

## 1.1. FORTIFICAÇÃO DE ALIMENTOS COM CÁLCIO

O cálcio é o catião mais abundante do corpo humano, representando 1 a 2% do peso total. Os ossos e os dentes contêm cerca de 99% de cálcio. O restante está distribuído nos fluidos intra e extracelulares. O cálcio circula no sangue em três formas: ligado a proteínas (cerca de 45%), complexado com citrato ou bicarbonato (cerca de 10%), ou a circular livremente na forma de  $\text{Ca}^{2+}$  (cerca de 45%). A forma ionizada é muito importante [10].

Há produtos naturalmente ricos em cálcio, como o leite e seus derivados, salmão, sardinha, brócolos e tofu, além de outros produtos fortificados com cálcio, como sumos de laranja e pão [11]. Na Inglaterra a farinha é fortificada com cálcio [10]. Os fortificantes de cálcio mais conhecidos são o carbonato de cálcio, o acetato de cálcio e o monofosfato de cálcio. O cálcio está presente na forma de sais insolúveis. Estes sais têm a mesma razão de absorção (entre 10 e 30%) que os naturalmente presentes nos alimentos.

Alguns vegetais verdes, como os espinafres contêm quantidades substanciais de cálcio. No entanto as suas formas de cálcio não são absorvidas. A exceção são os vegetais pertencentes ao género *Brassica* (nabo, couve romanesca) que são excelentes fontes de absorção de cálcio. Outras boas fontes são as amêndoas, figos e pêssegos secos. Os alimentos à base de cereais, como a massa alimentar (“pasta”), não são ricos em cálcio mas absorvem o cálcio da água da cozedura.

Para ser absorvido na sua forma ionizada ( $\text{Ca}^{2+}$ ), ele tem que ser primeiro libertado dos sais e a solubilização é feita no estômago a pH ácido. Assim, está dependente do pH e da presença de determinados alimentos. No intestino, a um pH mais básico, pode complexar e tornar-se menos biodisponível. A ingestão de

espinafres ou ruibarbo também evita a absorção de cálcio devido à presença nestes alimentos de grandes quantidades de ácido oxálico.

A vitamina D, a lactose do leite e o caseinoglicopéptido aumentam a solubilidade do cálcio e melhoram a sua absorção.

Por outro lado, as fibras não fermentáveis como a celulose e as hemiceluloses, presentes nos legumes, avelãs e cereais, ligam-se ao cálcio e diminuem a sua disponibilidade [11] e absorção ao ligarem-se ao cálcio no intestino [12]. Os alimentos com uma grande quantidade de fibras e ácido fítico (frequentemente associado à fibra) reduzem a absorção de cálcio. A fermentação das fibras aumenta a acidez do cólon, aumenta a solubilidade do cálcio e degrada o ácido fítico o que aumenta a absorção de cálcio nesta secção do intestino [10].

A absorção de cálcio varia de acordo com o sal: 39% para o carbonato de cálcio, 32% para o acetato de cálcio e lactato de cálcio e 27% para o gluconato de cálcio.

O gluconato de cálcio é usado de forma abrangente na indústria alimentar, é relativamente barato e contém cerca de 40% em peso. Para se obter 500mg de cálcio, um indivíduo necessita de ingerir 1,26g de Carbonato de Cálcio. [11]

O Carbonato de Cálcio é o recomendado para o uso em fórmulas de nutrição infantil. Apesar de ser insolúvel é bem absorvido. [10]

Como a quantidade diária de cálcio é muito maior que a quantidade dos outros micronutrientes adicionados, costuma ser adicionada separadamente da pré-mistura (“premix”) de vitaminas. Nestas pré-misturas de vitaminas estão presentes todos os outros componentes essenciais, como as vitaminas lipossolúveis (A, D, E, K<sub>1</sub>), as vitaminas hidrossolúveis do complexo B (B<sub>1</sub>, B<sub>3</sub>, B<sub>7</sub> e B<sub>9</sub>) e vitamina C e também Cloridrato de Piridoxina, Sulfato de Zinco, Maltodextrina e Iodato de Potássio, o que está de acordo com as recomendações dadas pelo grupo de especialistas internacionais em nutrição infantil (IEG). [13]

A ingestão baixa de cálcio e/ou perda excessiva levam à deficiência de cálcio, o que afecta principalmente os ossos e os músculos. Pode provocar nos adultos osteoporose, hipertensão, cancro do cólon e obesidade [10, 14].

A ingestão excessiva de cálcio, acima de 2500mg, parece não ter efeitos para a maioria dos indivíduos e é até recomendada uma ingestão acima desse valor para crianças com mais de um ano. Porém o seu consumo excessivo pode levar à deficiência de outros minerais no organismo, como o ferro (inibe as duas formas heme e não-heme) [15]. Nos adultos com falha renal e com propensão para terem a síndrome do leite alcalino, a ingestão de grandes quantidades de carbonato de cálcio não é recomendada pois pode levar à alcalose. Como o carbonato de cálcio é um antiácido muito forte, o seu uso contínuo pode alterar o equilíbrio ácido-base do sangue, provocando náuseas, cefaleia e fraqueza. Outras patologias associadas à ingestão excessiva de cálcio são a hipercalcémia e o depósito de cálcio nos tecidos moles [11,14] e nos rins devido à sobresaturação da urina em cálcio [10]. Há indicações de que a ingestão de quantidades altas de cálcio pode ajudar o risco de desenvolvimento de pedras nos rins e de cancro no cólon e pode ter um efeito favorável na pressão sanguínea [7].

Na Europa a quantidade média de Cálcio ingerida situa-se entre os 600 e os 1500 mg por dia. Em contraste, na China a quantidade é de 380 mg por dia. De acordo com a directiva 2006/125/EC de 5 de Dezembro de 2006, a quantidade de cálcio ingerida não pode ser inferior a 8 mg/100Kcal.

## 1.2. FORTIFICAÇÃO DE ALIMENTOS COM FERRO

O corpo humano contém entre 2 e 4 gramas de ferro. O ferro está presente em maior proporção na hemoglobina. A quantidade de ferro num indivíduo depende da sua idade.

O ferro existe em vários estados de oxidação, de  $\text{Fe}^{6+}$  até  $\text{Fe}^{2+}$ . As formas que se encontram no corpo humano e nos alimentos são a forma férrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ) e a forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ).

O ferro da dieta encontra-se em duas formas: heme e não-heme. A forma Heme encontra-se na carne e no peixe. A forma não-heme encontra-se nas frutas, vegetais, grão, avelãs, leite, queijo e ovos. Os produtos à base de leite são pobres em ferro.

Os alimentos mais ricos em ferro são o fígado [12], as carnes vermelhas, ostras, amêijoas, favas e vegetais de folha escura [11].

O pão, farinhas, arroz e cereais de pequeno-almoço são frequentemente fortificados com ferro. Os compostos de ferro usados como fortificantes dividem-se em três categorias principais:

- Solúveis em água, como o sulfato ferroso e lactato ferroso;
- Pouco solúveis em água mas solúveis em ácido diluído, como o fumarato ferroso;
- Insolúveis em água e pouco solúveis em ácido diluído, como o pirofosfato de ferro.

Na tabela 1 estão representadas as principais características-chave dos fortificantes usados frequentemente na indústria alimentar.

*Tabela 1 - Características-chave dos compostos de ferro usados frequentemente na fortificação de alimentos: solubilidade, biodisponibilidade e custo.*

Composto	Conteúdo de Ferro (%)	Biodisponibilidade Relativa <sup>a</sup>	Custo Relativo <sup>b</sup> (por mg de Ferro)
<b>Solúveis em água</b>			
Sulfato Ferroso .7H <sub>2</sub> O	20	100	1,0
Sulfato Ferroso, Seco	33	100	1,0
Gluconato Ferroso	12	89	6,7
Lactato Ferroso	19	67	7,5
Bisglicinato Ferroso	20	>100 <sup>c</sup>	17,6
Citrato de Amônio Férrico	17	51	4,4
EDTA de Sódio Férrico	13	>100 <sup>c</sup>	16,7
<b>Pouco Solúveis em Água, solúveis em ácido diluído</b>			
Fumarato Ferroso	33	100	2,2
Succinato Ferroso	33	92	9,7
Sacarato Férrico	10	74	8,1
<b>Insolúveis em água e pouco solúveis em ácido diluído</b>			
Ortofosfato Férrico	29	25-32	4,0
Pirofosfato Férrico	25	21-74	4,7
<b>Formas Encapsuladas</b>			
Sulfato Ferroso	16	100	10,8
Fumarato Ferroso	16	100	17,4

Legenda: EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

<sup>a</sup> Em relação ao sulfato ferroso heptahidratado, em Humanos adultos

<sup>b</sup> Em relação ao sulfato ferroso seco. O custo do sulfato ferroso seco e hidratado é o mesmo, por mg de ferro

<sup>c</sup> Absorção é três vezes maior que o sulfato ferroso se o conteúdo de fitatos do veículo alimentar é alto.

As formas solúveis em água são as mais utilizadas para fortificar farinhas de cereais, leite em pó e produtos de nutrição infantil [9].

O sulfato ferroso é o composto solúvel em água mais utilizado como fortificante, principalmente por ser mais barato. No entanto, dependendo das suas características físicas, o clima e o conteúdo de gordura do produto onde é adicionado, pode causar rancidez [9], descolorar [16] e oxidar o alimento em que é adicionado [12].

Os compostos da segunda categoria, solúveis em ácido, são também bastante solúveis em água. No entanto levantaram-se algumas questões no seu uso em produtos usados em crianças, porque secretam menos ácido, mas ainda não surgiram estudos sustentando essa hipótese. Estes compostos, por serem menos solúveis em água também causam menos problemas organolépticos.

O Fumarato Ferroso é dos mais usados nesta categoria. Tem uma biodisponibilidade igual à do Sulfato Ferroso e é também usada na fortificação de produtos de nutrição infantil e também de farinhas de milho e de trigo. Também existe Fumarato Ferroso na forma encapsulada, que é usado na nutrição infantil em produtos mais complexos. A função da cápsula (frequentemente formada por óleos vegetais hidrogenados, mono e diglicéridos, maltodextrinas e celulosas de etilo) é separar e proteger o ferro dos outros compostos e potenciais inibidores de absorção, atenuando assim as modificações sensoriais e de cor. A principal vantagem da forma encapsulada é o aumento da sua biodisponibilidade, apesar de esta forma ser mais cara do que o Fumarato Ferroso. Outra vantagem é a sua protecção, impedindo que os iões ferrosos sejam oxidados para a forma férrica. A presença de cerca de 10% de iões férricos resulta numa descoloração. Por último, melhora a estabilidade oxidativa dos lípidos [17].

Em comparação com o sulfato ferroso, os compostos da terceira categoria têm um grau de absorção de cálcio entre 20 e 75%. Apesar de serem pouco absorvidos, continuam a ser usados porque são menos afectados pelas características dos alimentos e continuam a ser solúveis no pH do suco gástrico [18], além de serem mais baratos.

O pirofosfato de ferro é usado para fortificar produtos de nutrição infantil que contenham banana desidratada e também são usados para fortificar arroz e alimentos contendo chocolate. Apesar de terem uma biodisponibilidade baixa, esta vai-se modificando durante o processamento.

O ferro na forma heme é hidrolizado pelas proteases do estômago e intestino delgado. A absorção ocorre ao nível do duodeno. A forma não-heme é quebrada enzimaticamente no tracto gastrointestinal, pela pepsina do estômago e pelas proteases do intestino delgado. A forma férrica libertada ( $\text{Fe}^{3+}$ ) é solúvel no pH ácido do estômago. A um pH mais básico forma um complexo de Hidróxido de Ferro ( $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ), um composto insolúvel que tem tendência a agregar e a precipitar.

Os agentes quelantes ou ligandos inibem a absorção de ferro, ao ligarem-se à forma não-heme e formando um complexo. Também há outros compostos presentes nos alimentos da dieta que interferem com a absorção de ferro, como os polifenóis do chá e café, o ácido oxálico dos espinafres, bagas e chocolate, o ácido fítico do milho e dos legumes [19], o EDTA, a fosvidina (glicoproteína fosforilada) existente na gema de ovo [12,20], o malonaldeído [17] e o próprio cálcio, sais de fosfato de cálcio, zinco, manganês e níquel. O ácido fítico existente nos produtos de nutrição infantil tendo na sua base farinha de soja, inibem a absorção do ferro [13,18]. No entanto, o efeito do ácido fítico na absorção do ferro pode ser inibido se estiver presente ácido ascórbico. Este tem um efeito potenciador na absorção de ferro quando a sua concentração é, no mínimo, o dobro da do ferro e do ácido fítico [18]. Outros compostos que têm um efeito benéfico na absorção do ferro são a vitamina A e E e o ácido fólico.

Durante a fase de gravidez a dose recomendada de ferro é de 27 mg por dia e de 9 mg por dia durante a fase de lactação [8]. Os bebés no período anterior à introdução de alimentos na sua dieta, devem ingerir 1 mg por kg de peso (ou 1 mg/100 Kcal), por dia. Para crianças a dose recomendada é de 10 mg por dia [17].

A directiva 2006/125/EC de 5 de Dezembro de 2006 considera a ingestão adequada de Ferro na dose de 3 mg/100Kcal.

Os produtos de nutrição infantil fortalecidos com ferro são criados para a etapa de crescimento entre os 9 e os 12 meses [18], altura em que as crianças recebem também grandes quantidades de ferro oriundas da sua dieta, logo a quantidade de ferro a adicionar a esses produtos situa-se nos valores mínimos, só suprimidas em população com riscos conhecidos de deficiência de ferro [13].

A população tem necessidade de ingerir maiores quantidades de ferro, devido à perda de ferro ser muito grande por causa da baixa percentagem de absorção, que é influenciada por várias doenças, stress, efeitos ambientais, tipo de dieta e ingestão de medicamentos.

Nas crianças, os sintomas associados à falta de ferro são a palidez (associada à anemia), distúrbios de comportamento, diminuição da capacidade cognitiva, limitação da capacidade de aprendizagem e falta de atenção [21]. Em adultos a falta de ferro diminui o desempenho no trabalho e consequentemente a produtividade, enfraquece o sistema imunitário, diminui a resistência às infecções e a capacidade de manter a temperatura corporal.

O aumento duas vezes o normal da ingestão de ferro provoca hemacromatose. O ferro absorvido é depositado progressivamente nos tecidos, especialmente no fígado, coração e pâncreas, entre outros, causando dano e até falência destes órgãos [11]. O excesso de ferro armazenado no organismo provoca o risco de cancro e ataque cardíaco [20].

No laboratório físico-químico da Fábrica da Nestlé de Avanca realiza-se o controlo da quantidade de cálcio e ferro em produtos de Nutrição Infantil. O doseamento é efectuado usando a metodologia de absorção atómica. É um processo demorado, cuja análise demora cerca de cinco horas.

Para que o controlo seja mais eficaz, é necessária a implementação de uma metodologia de análise que se imponha como uma alternativa credível e precisa que faça a análise num espaço de tempo mais reduzido e que possa ser utilizada por um operador da produção. Com essa finalidade, o aparelho de Fluorescência por Raio-X torna-se um aparelho funcional na quantificação rápida de cálcio e ferro num local de produção em contínuo. Com o aparelho de XRF diminui-se o tempo de liberação do produto para o mercado e também a quantidade de produto para retrabalhar [22].

Para que o aparelho possa operar nas melhores condições é necessária a implementação de um modelo de calibração e posterior validação e monitorização do método para nos assegurarmos que é adequado para a análise de todos os produtos de nutrição infantil.

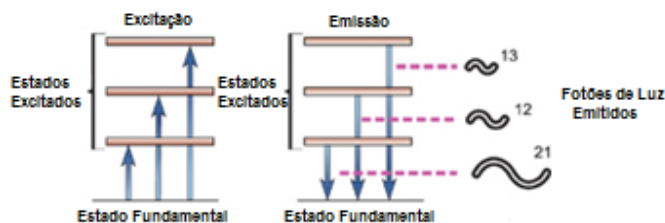
De seguida irei explicar os fundamentos teóricos necessários sobre raio-X, absorção atómica e a metodologia para calibrar e validar o aparelho de XRF.

## 1.3. ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO ATÔMICA COM CHAMA

A espectroscopia de absorção atômica com chama é uma técnica que permite a determinação do teor de vários minerais numa grande variedade de amostras através da medição da energia libertada no momento do seu retorno ao estado fundamental, por absorção da quantidade correspondente de energia de um feixe de luz incidente.

Os electrões existem em vários níveis de energia dentro de um átomo. Esses níveis têm energias bem definidas e os electrões ao se moverem entre eles emitem energia para passarem para um estado de maior energia e absorvem energia para passarem para um nível de energia mais baixo e em consequência disso emitem um fóton com diferentes comprimentos de onda (figura 1).

É a absorção de energia dos electrões que vai interessar para a espectroscopia de absorção atômica e nomeadamente para a análise que irei realizar. Há muitas transições electrónicas, resultando cada transição na emissão de um fóton com um comprimento de onda bem definido.

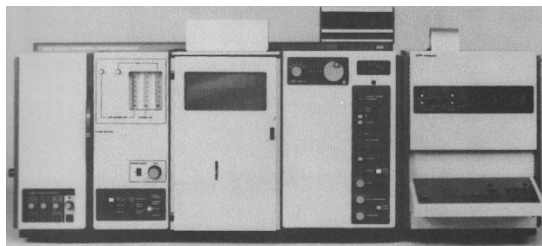


*Fig. 1 - Transições de energia.*

*(adaptado de [http://www.andor.com/image\\_lib](http://www.andor.com/image_lib))*

### 1.3.1. CONSTITUIÇÃO DO APARELHO DE ABSORÇÃO ATÔMICA

O aparelho de absorção atômica que vou usar é um Espectrofotômetro Philips Pye Unicam SP9.



*Fig. 2 - Imagem do Espectrofotômetro existente no laboratório Físico-Químico da Fábrica de Avanca (Retirado de [23])*



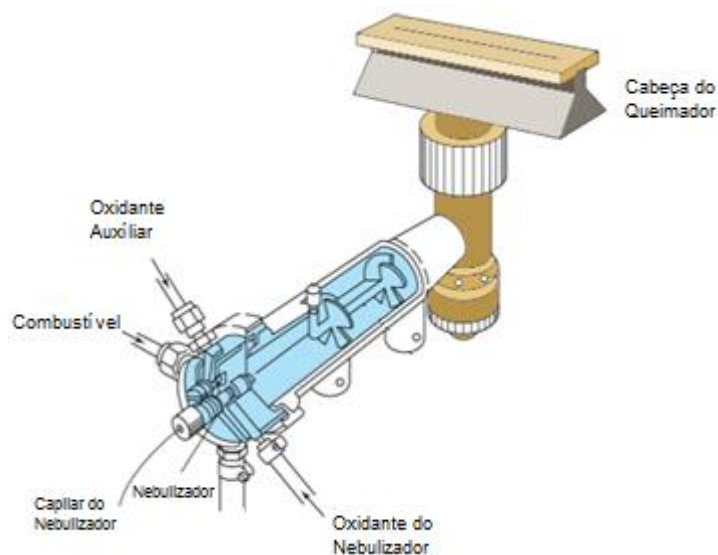
À esquerda do espectrofotómetro encontra-se um conjunto de lâmpadas de cátodo oco com um cátodo dos quatro elementos usados mais frequentemente. Estas lâmpadas quando ajustadas em posição e seleccionando o seu comprimento de onda apropriado permitem a análise dos elementos respectivos, cálcio, ferro, sódio e Zinco, podendo também ser lido o potássio, por troca de uma delas.

A tabela 2 apresenta as condições para o cálcio e o ferro.

*Tabela 2 - Condições ajustadas no espectrofotómetro com chama*

Elemento	Gás Combustível/ Gás de Suporte	Comprimento de Onda (nm)	Correcção de Ruído de Fundo ("Background")
Cálcio	Acetileno/Ar	422,7	OFF
Ferro	Acetileno/Ar	248,3	ON

Na zona central do aparelho encontra-se o nebulizador e o queimador.



*Fig. 3 - Esquema do nebulizador e do queimador.*

(adaptado de [http://faculty.sdmiramar.edu/fgarces/LabMatters/Instruments/AA/Pic\\_AAS](http://faculty.sdmiramar.edu/fgarces/LabMatters/Instruments/AA/Pic_AAS))

O feixe sai por uma janela em direcção ao monocromador e posteriormente em direcção ao detector onde são processados os sinais.

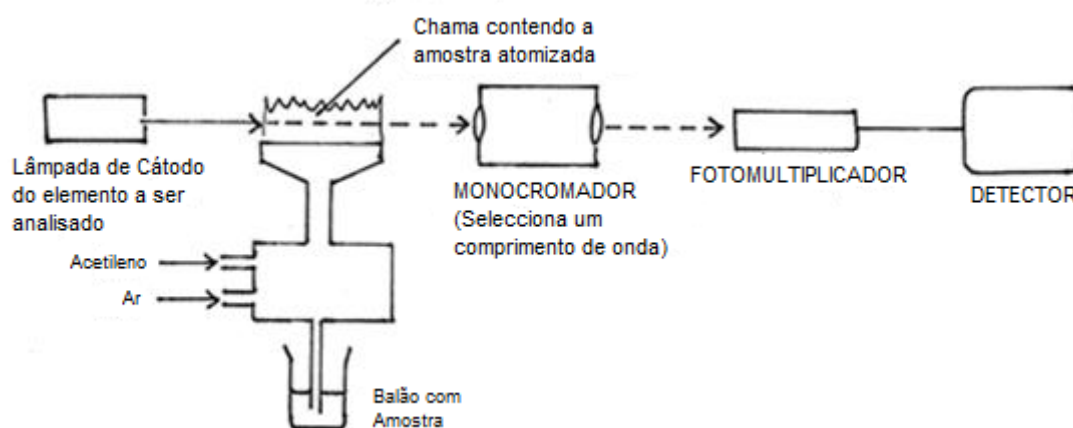


Fig. 4 - Esquema simplificado de Absorção atômica.  
(adaptado de <http://hsc.csu.edu.au/chemistry/core/monitoring>)

A ponta do tubo capilar que está ligado ao nebulizador é mergulhado na amostra que se pretende analisar. A amostra vai sendo aspirada para dentro do nebulizador. Ao mesmo tempo o gás oxidante ou gás de suporte – ar – passa pelo gás combustível – o acetileno - e entram para dentro do nebulizador. A velocidade alta do caudal do ar para dentro do nebulizador dispersa a amostra num spray muito fino. Este spray é de seguida disperso ao chocar com uma pequena ansa de plástico posicionada mesmo em frente ao nebulizador e que pode ser regulável, permitindo uma maior ou menor dispersão. O jacto disperso entra depois no queimador [23].

Resumindo, o acetileno (gás combustível) e o ar (oxidante) são misturados com a amostra nebulizada na câmara de spray e passam para o queimador. A temperatura da chama no queimador é aproximadamente 2300°C [24].

### 1.3.2. FUNCIONAMENTO DO MONOCROMADOR E DO DETECTOR

A solução que se está a analisar, depois de vaporizada entra em contacto com a chama e os elementos são vaporizados e atomizados. A fonte de luz (lâmpada do cátodo) emite pulsos de radiação que são direccionados para a chama. Alguns dos átomos que estão dispersos no vapor absorvem uma proporção dessa radiação, o que resulta num decréscimo da radiação que emerge do vapor e este decréscimo é medido por um detector. À saída do detector a radiação é convertida electronicamente em voltagem que é proporcional à intensidade de radiação que entra no monocromador [24]. A informação que sai do detector é comparada com uma voltagem gerada internamente e passa depois por um circuito para se obter uma leitura logarítmica que é aproximadamente linear com a concentração. A leitura é dada em absorvância, em  $\mu\text{g/ml}$ . [23]

Para terminar é necessário converter o valor obtido para  $\text{mg}/100\text{g}$ , que são as unidades mais comuns usadas para definir a concentração das amostras de referência.

A absorção atômica é uma técnica que é ainda usada actualmente por ter custos baixos e uma boa selectividade. No entanto apresenta desvantagens relativamente à sensibilidade. Esta limitação pode dever-se à associação de dois factores: eficiência limitada da amostra e permanência curta do analito na chama. Também tem uma baixa eficiência porque somente 10% da solução nebulizada atinge a chama. Por último, os processos de atomização da amostra (evaporação, vaporização e dissociação) ocorrem num período curto de tempo (inferior a 1 ms). [25]

Comparativamente ao método alternativo de fluorescência por raio-X é um método que também tem desvantagens porque na preparação de amostras são necessários reagentes perigosos para a saúde e para o meio ambiente e é um processo bastante demorado.

## 1.4. ESPECTROSCOPIA DE RAIOS-X

Os raios-X fazem parte do espectro electromagnético e são caracterizados por energias que se situam entre a radiação ultra-violeta e a radiação gama ( $\gamma$ ), no intervalo entre os 0,1 nm e os 10 nm, que são equivalentes a energias entre os 125 KeV e 0,125KeV. [8]

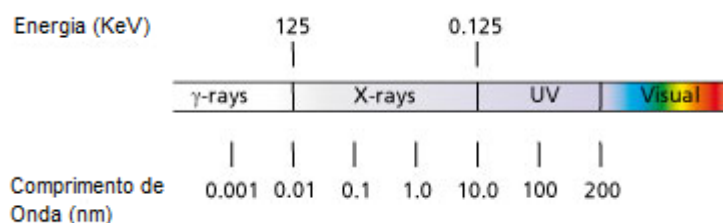


Fig. 5 - Espectro electromagnético

(Retirado de <http://www.panalytical.com/index.cfm?pid=130>)

### 1.4.1. PROCESSO BÁSICO DE PRODUÇÃO DOS RAIOS-X

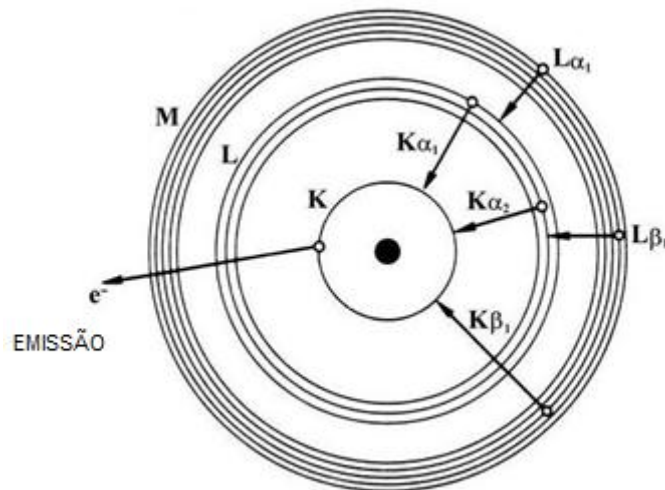
A fluorescência por raios-X pode ser considerada como um processo de três passos simples que ocorrem ao nível atómico:

- 1) Um fotão de raio-X incidente, com uma energia superior à energia de ligação do electrão ao átomo, liberta um electrão de uma das orbitais que rodeiam o núcleo de um dos átomos da amostra;

- 2) Um espaço é produzido na orbital, resultando numa configuração de maior energia, mais instável.

- 3) Para repor o equilíbrio, há a transferência de um electrão de uma orbital de maior energia para o espaço deixado. O excesso de energia é libertado sob a forma de radiação de raio-X fluorescente.

As transferências de electrões ocorrem sempre de orbitais de maior energia para as orbitais de menor energia. Assim, podem acontecer das orbitais M e L para a orbital K ou da orbital M para a orbital L. [8]



*Fig. 6 - Transições electrónicas existentes num átomo.  
(retirado de [26])*

As letras gregas  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  juntamente com os números 1,2 e 3 dão informações de onde provém o electrão que ocupou o espaço deixado pelo electrão ejectado. [12,27]

De seguida estão apresentados alguns exemplos de transições envolvendo essa nomenclatura:

$K\alpha_1$  – Electrão do sub-nível LIII para o nível K

$K\alpha_2$  – Electrão do sub-nível LII para o nível K

$K\alpha_{1,2}$  aparece quando nenhuma radiação é encontrada pelo espectrofotómetro

$K\beta_1$  – Electrão do sub-nível M para o nível K

$L\alpha_1$  – Electrão do sub-nível M para o nível L

A diferença de energia entre o electrão expelido e o electrão substituído é característica do elemento. Assim, a energia de radiação de raio-X fluorescente está directamente ligada ao elemento específico que está a ser analisado.

## 1.4.2. O APARELHO DE XRF

### O TUBO DE RAIOS-X

O tubo de raio-X é formado por um cátodo composto por um filamento e um ânodo de Ródio, que permite a excitação tanto de elementos leves como pesados. [12] Entre eles é gerada uma diferença de potencial. Uma fonte de alta voltagem vai alimentar o cátodo com uma potência de 9W e o tubo com alta voltagem de 30kV, para acelerar os electrões que vão a uma corrente máxima de 1 mA (figura 8). Os electrões saem do cátodo, são acelerados no campo eléctrico e chocam contra o

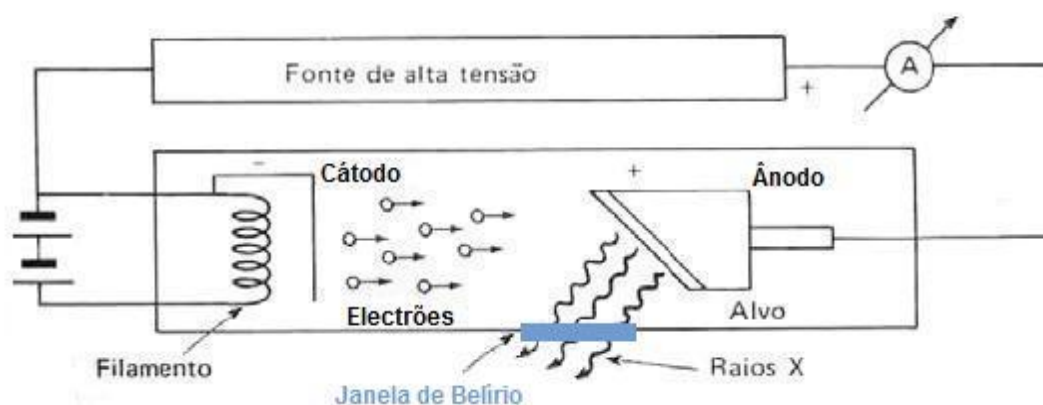
material do ânodo. Ao serem acelerados por uma voltagem de 30kV, os electrões adquirem uma energia de 30KeV.



*Fig. 7 - Fonte de raios-X.  
(Retirado de documentação interna da Nestlé)*

O tubo de raio-X tem uma janela de Belírio, com uma dimensão entre 75 e 125 micrómetros, que é permeável à passagem dos raios-X. O ânodo também pode ter outro material, como Titânio, Crómio, Ferro, Cobre, Molibdénio e Tungsténio [28]. O tungsténio serve para excitar elementos mais pesados, enquanto que o crómio é usado para excitar elementos mais leves. [8]

A desaceleração dos electrões por contacto com o Ródio forma os fotões de raio-X, que irradiam em todas as direcções [20]. Os átomos têm um número atómico de 45 (correspondente ao número atómico do Ródio) e conseguem excitar todos os elementos da tabela periódica que tenham um número atómico inferior [29].



*Fig. 8 - Formação de raios-X  
(adaptado de [10])*

Os raios-X que saem do alvo são constituídos por uma mistura de diferentes comprimentos de onda e a variação de intensidade depende da voltagem do tubo.

Observando a figura seguinte, pode-se verificar que quando a voltagem faz aumentar a intensidade dos raios-X medidos, a emissão de electrões acontece a um comprimento de onda mais baixo. [20]

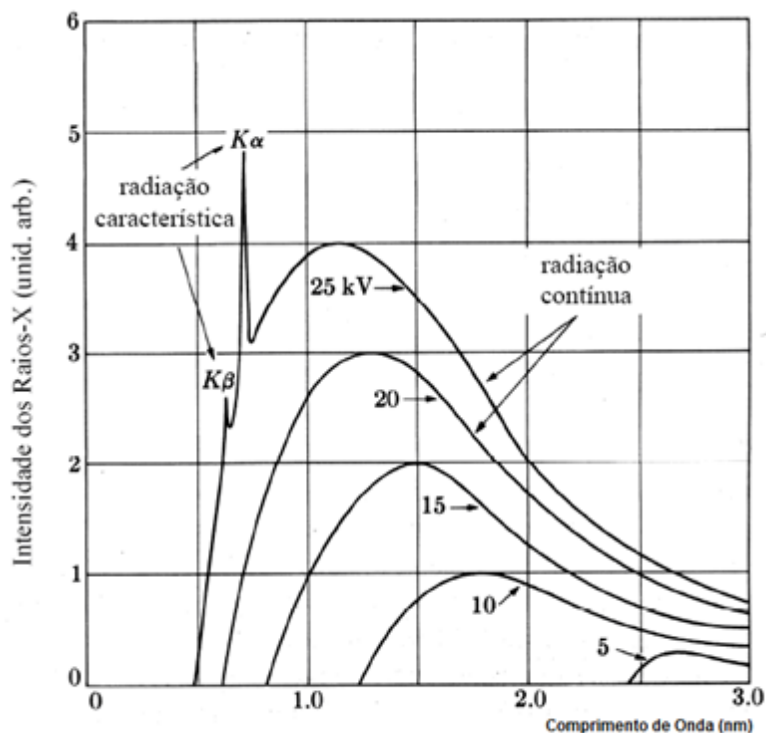


Fig. 9 - Radiação característica e radiação contínua.  
(retirado de [31])

Somente 1 a 2% da energia perdida (dependendo do material do ânodo) é irradiada na forma de raios-X. A maior parte da energia contribui para aquecer o ânodo, logo este tem que ser arrefecido com ar.

## ESPECTRO CONTÍNUO DE RADIAÇÃO

Quando os electrões acelerados pelo cátodo chocam com o ânodo desaceleram e libertam energia contínua, em alemão “Bremsstrahlung” (radiação de travagem). No entanto nem todos são desacelerados da mesma forma. Uns libertam a energia toda de uma só vez dando origem a fotões de raio-X de energia máxima. Outros perdem somente uma fracção da sua energia cinética total e originam fotões de menor energia. [30]

Quando a voltagem é superior à energia da ligação do electrão ao átomo, isto é, quando a energia supera o valor crítico de ligação, característico do metal do ânodo, no espectro contínuo aparecem picos finos e de intensidade bem definida em certos comprimentos de onda. São chamados de “linhas características”. Estas linhas resultam das transições entre os níveis de energia e todas as linhas juntas formam o “espectro característico” do metal do cátodo. Observe a figura 9 onde está representada a radiação característica de um dado elemento.

## **FILTROS DO TUBO**

Os filtros do tubo situam-se no caminho óptico entre o tubo de raio-X e a amostra. Têm como função filtrar componentes indesejados ou interferentes da radiação que sai do tubo e melhorar a razão entre o sinal e o ruído. [12]

## **AMOSTRA**

A facilidade de leitura dos elementos constituintes de uma amostra depende das suas características físicas, como a sua compactação e da energia do feixe que chega à amostra, e químicas, como a percentagem de cada elemento na amostra.

### **• CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA**

Iremos ver mais à frente que se estipulou uma moagem das amostras para controlar os efeitos da matriz. Ainda assim, existe a nível do programa do aparelho um factor alfa que, quando utilizado, prevê e corrige os possíveis efeitos da matriz na amostra. [28]

A capacidade de penetração dos raios-X varia entre alguns micrómetros até alguns milímetros, dependendo da composição da matriz da amostra.

Quanto maior a densidade do material, maior será a absorção de raio-X.

As características químicas dos elementos também interferem na leitura das amostras. Elementos mais leves, absorvem melhor que elementos mais pesados. O que quer dizer que, entre o cálcio e o ferro, o ferro vai absorver melhor a radiação. Mas encontra-se em menor quantidade do que o cálcio na amostra.

A capacidade dos raios-X penetrarem e se escaparem da amostra depende dos elementos que estão a ser detectados. Os elementos como o ferro têm raios-X de muito baixa energia logo são muito difíceis de detectar, mesmo em concentrações muito baixas. O cálcio tem radiações muito mais energéticas e por isso os raios-X vão ter a capacidade de penetrar para zonas mais interiores da amostra.

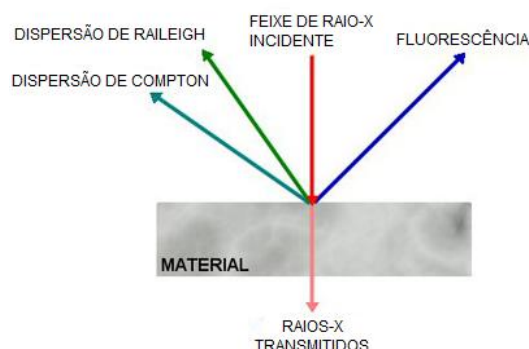
Quanto maior a concentração dos elementos pesados, mais reduzida é a possibilidade de os raios-X se escaparem de dentro da amostra.

### **• ENERGIA DO FEIXE QUE CHEGA À AMOSTRA**

Quando os raios-X que chegam à amostra, alguns são absorvidos e outros são difundidos (dispersos). Como vão perdendo a sua energia, dificilmente nas condições em que o aparelho opera (em termos de voltagem e corrente) eles conseguem ser transmitidos através do material.



A dispersão das ondas no material pode ocorrer com ou sem perda de energia, sendo chamada de dispersão “Compton” ou “Rayleigh”, respectivamente, como mostrado na figura seguinte.



*Fig. 10 - Dispersão das ondas numa amostra. (retirado de [28])*

Em amostras compostas maioritariamente por elementos leves, como o Ferro, a proporção de radiação dispersa é alta. Isso não acontece com as amostras que irei usar, pois têm uma quantidade elevada de Cálcio e uma pequena quantidade de ferro, logo espera-se que a dispersão de luz seja baixa.

A difusão de luz pode ser reduzida se colocarmos um material absorvente (filtro) entre o tubo e a amostra. Nas condições que irei usar para a determinação de cálcio e ferro, irei usar um filtro de alumínio.

Como já referido anteriormente, a energia do fóton de raio-X incidente é de extrema importância para que seja possível a remoção dos electrões das orbitais e a emissão de energia devido à migração dos electrões vizinhos para a orbital desocupada de menor energia. Assim, é necessário que a energia dos fótons de raio-X seja maior que a energia de ligação do electrão ao núcleo do elemento que se está a determinar. No entanto, se a energia da radiação incidente também for demasiado alta, o emparelhamento entre o electrão e o fóton não se concretiza e apenas alguns electrões são libertados. À medida que a energia dos fótons de raio-X se reduz e se aproxima da energia de ligação dos electrões, a quantidade de electrões expelidos aumenta. [28]

Se a voltagem gerada pelo cátodo for suficiente para excitar múltiplos estados de energia (K, L) então ambas as radiações incidem na amostra. Usualmente as K são mais intensas, logo penetram mais.

Se a voltagem for reduzida, as bandas de menor energia (K) não são excitadas e a radiação característica terá apenas linhas L e como resultado a penetração será muito reduzida. [28]

Radiação com comprimentos de onda maiores (menor energia) é absorvida mais rapidamente.

## COLIMADOR

O colimador é constituído por um conjunto de placas metálicas com buracos no meio, designado para absorver todas as radiações que não estão a viajar na direcção correcta. Pode ter a dimensão entre 12 micrómetros até vários milímetros. Permite gerar feixes de raio-X estreitos. Porém, pode ocorrer perda de intensidade à medida que diminui o diâmetro do feixe.

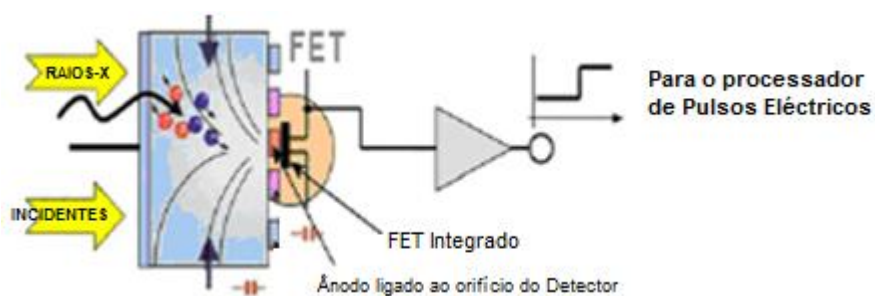
## DETECTOR

O detector é a unidade física que permite interpretar os sinais que são difundidos da amostra sob a forma de raios-X.

O espectrómetro de fluorescência por raio-X Minipal4 possui um sistema de detecção de dispersão de energia. Mede directamente as diferentes energias dos raios-X fluorescentes emitidas pela amostra. Ao contar e representar a quantidade relativa de raios-X associado a cada energia, gera um espectro de XRF, característico da amostra que se está a analisar.

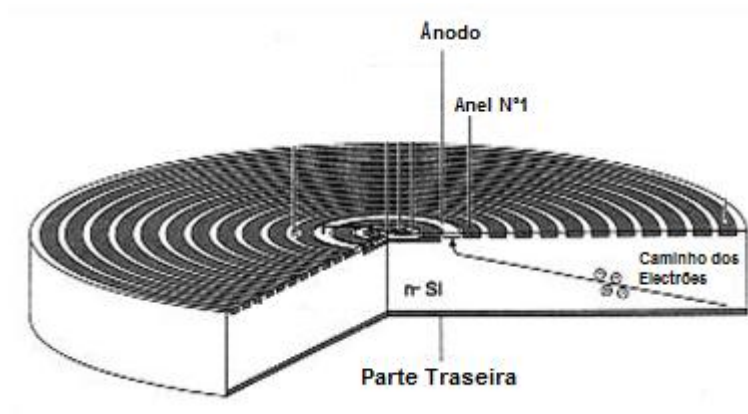
O detector é do tipo SDD (“silicon drift detector”). Forma pares de electrões num material condutor (frequentemente silício). Assim que isto acontece, os electrões são removidos do detector e a corrente resultante é proporcional ao número de pares de electrões, que está também directamente relacionada com a energia do feixe de raio-X. Este procedimento é repetido várias vezes e o resultado é um gráfico de barras com níveis diferentes de energia. [32]

Os raios-X entram por uma janela fina de Bérlio e produzem pares de electrões na região semicondutora do detector. O número de pares de electrões formados depende da energia dos raios-X que chegam ao detector. Quanto maior a energia, mais electrões irão ser formados. Aqui é também aplicada uma alta voltagem para puxar os electrões para a parte traseira do detector, que são gravados como pulsos negativos.



*Fig. 11 - Esquema do percurso dos electrões no detector*  
(adaptado de <http://www.bruker-axs.com/xflashsddx-raydet0.html>)

Eléctrodos concêntricos são colocados na superfície traseira do silício, que são usados para puxar os electrões que chegam, provenientes da absorção por raio-X, para o centro do chip. Os electrões são recolhidos como um pulso negativo e contados pelo analisador.



*Fig. 12 - Detector SDD (Silicon Drift Detector)*

*(adaptado de [33])*

A unidade de contagem mede a energia dos fotões de raio-X que chegam ao detector em cada segundo e converte-os em pulsos de intensidade, proporcionais à energia dos respectivos fotões. A intensidade dos feixes por segundo é dada por cps, "counts per second" e contém a informação acerca da concentração dos elementos emitidos pela amostra. [26]

O XRF é uma técnica de análise quantitativa em que o tamanho do pico (altura) de cada elemento é directamente relacionado com a concentração desse elemento no volume da amostra.



## **CAPÍTULO 2**

# **CALIBRAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ALTERNATIVO**

## **2.1. CALIBRAÇÃO DO MÉTODO**

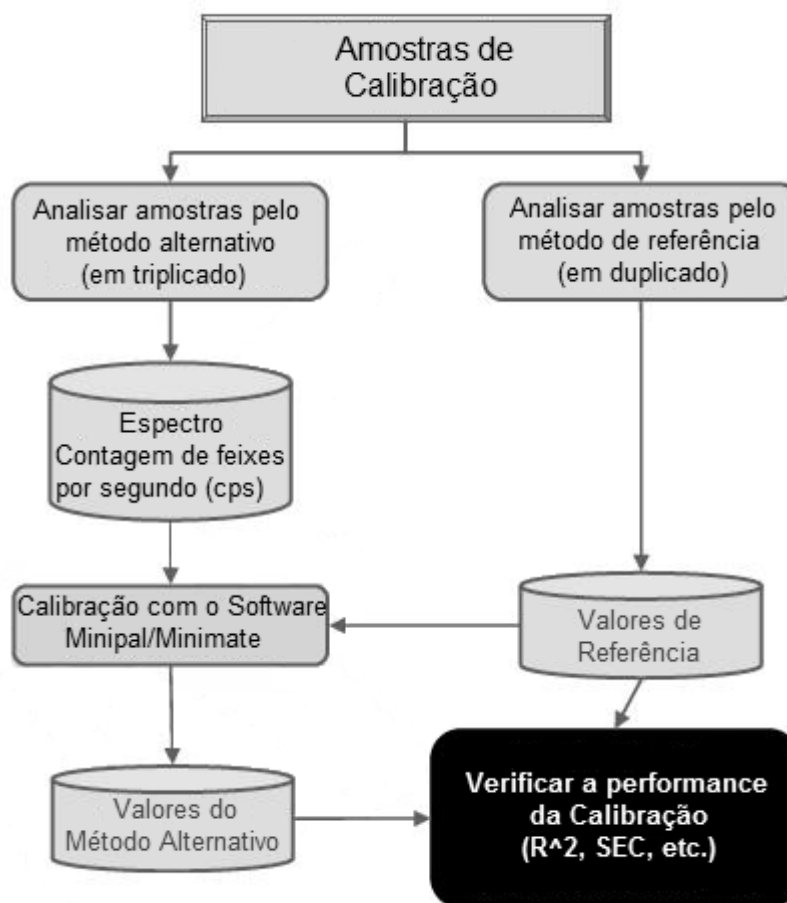
### **2.1.1. PRINCÍPIOS DA CALIBRAÇÃO**

A calibração é um processo matemático aplicado às variáveis do aparelho, para ajustar os valores obtidos pelo aparelho aos valores das amostras de referência usadas e determinar a sua proporcionalidade e linearidade.

Durante a calibração, as amostras com valor de referência conhecido são medidas e é traçado um gráfico da intensidade dos feixes por segundo (cps) em função da energia dos electrões do aparelho (KeV). As unidades de cps representam a contagem de fotões de raios-X que chegam ao detector por segundo. Para que seja possível comparar os resultados do aparelho (em cps) com os resultados da absorção atómica (em mg/100g) e assim determinar a diferença entre eles, faz-se uma correlação (aplicação da relação proporcional) de todos os resultados para determinar o grau de relação entre as duas variáveis [34]. Depois de a curva de calibração estar traçada é possível extrapolar directamente os resultados dados pelo aparelho em cps para os valores de concentração correctos.

Na generalidade, uma calibração pode ser realizada quando se pretende usar pela primeira vez um aparelho para se fazer uma determinada análise a um determinado produto mas também é necessário fazer a recalibração cada vez o método está fora de controlo e se detectam desvios na fase de monitorização do método (como irei descrever mais à frente).

A figura seguinte representa os passos principais envolvidos na calibração do método:



*Fig. 13 - Passos essenciais envolvidos na calibração do método.*

As amostras são analisadas pelo método de referência e pelo método alternativo. Como referido anteriormente o programa do aparelho regista o número de fótons de raio-X que chegam por segundo ao detector. A existência de um valor de referência permite traçar uma curva de calibração e a partir daí é possível extrapolar as unidades dadas pelo aparelho para as unidades de concentração e obter um valor alternativo. Posteriormente o valor de referência e o valor alternativo são comparados e é verificada a performance da calibração.

O que é mais importante controlar quando se faz uma calibração é primeiro de tudo a diferença entre os valores alternativos e de referência das amostras que tem que ser o menor possível para que o método alternativo possa ser considerado viável, ou seja, para se impor como alternativa ao método de referência. Para isso é necessário escolher um lote de amostras cujos valores sejam os mais próximos possíveis, isto é, que estejam altamente correlacionados entre si.

## • SELECÇÃO DAS AMOSTRAS

A selecção das amostras é uma base importante para uma calibração precisa. O conjunto de amostras de calibração é adequado quando representa todos os produtos disponíveis na linha de produção, em quantidade suficiente. Devem seleccionar-se as

amostras que são representativos da composição, variabilidade estrutural e concentração dos produtos a serem analisados diariamente.

Na indústria alimentar o objectivo que se pretende é produzir um produto que cumpra com os requisitos em termos de informação nutricional. O objectivo é sempre obter um produto com um painel nutricional semelhante, mas o resultado final acaba por variar, devido essencialmente às especificações da matéria-prima e à homogeneização dos ingredientes.

O produto final antes de sair para o mercado tem que cumprir com todas as especificações mas há um intervalo legal aceite para cada produto. No caso do cálcio e do ferro, apesar de esse intervalo dar alguma liberdade, o resultado obtido por absorção atómica é quase sempre o mesmo. Porém, se houver alguma falha a nível da adição de algum dos componentes da receita durante a mistura a seco que interfiram com o valor do cálcio e do ferro, o aparelho tem que ter a capacidade de detectar essa falha, dando uma resposta adequada e fiável.

Assim, uma calibração deve ser a mais extensa possível mas, por outro lado, deve ser realista e ajustada à gama de concentração do produto que se está a produzir. Uma gama de concentração 30% abaixo e acima do mínimo e do máximo, respectivamente, é o suficiente. Devem escolher-lhe amostras que ocupem toda a gama de concentração, o que se torna difícil somente com amostras de produção.

Para se resolver esta limitação é necessário se proceder à formação de amostras especiais – “spiked samples” (amostras fortificadas). Para que estas amostras sejam idênticas às amostras de produção, tem que se seguir o mais próximo possível a receita variando somente a quantidade de cálcio e ferro adicionado. O procedimento de adição a seco e de homogeneização dos nutrientes, que se faz na linha de produção, pode ser reproduzido em laboratório, usando todas as matérias-primas em quantidades menores e respeitando a proporção dos ingredientes.

## • NÚMERO DE AMOSTRAS

O número de amostras que são necessárias para a calibração depende da complexidade dos produtos a serem analisados. Se as amostras a serem analisadas contém apenas alguns componentes que variam em concentração, então há um baixo número de variáveis e um conjunto pequeno de amostras de calibração é adequado para definir a relação entre as variáveis e as concentrações [35]. A norma ASTM E1655-5 defende que o número de amostras de calibração, depois de se eliminarem os valores aberrantes deve ser pelo menos seis vezes maior que o número de variáveis usadas no modelo [36]. O que se recomenda a nível das instruções laboratoriais da Nestlé é o uso entre 25 e 30 amostras de calibração.

## • DETERMINAR O NÚMERO DE VARIÁVEIS DO MÉTODO

No caso de se desconhecerem o número de variáveis existentes, pode-se fazer um PCR (Análise de Regressão de Componentes Principais) ou, em alternativa, fazer a comparação do erro padrão de calibração (SEC) com o desvio padrão da repetibilidade

(SD(r)). Estes dois métodos dão uma indicação do número máximo de variáveis a incluir no modelo de calibração [31].

### **2.1.2. PROCESSAMENTO ESTATÍSTICO DOS RESULTADOS DE CALIBRAÇÃO**

Os valores de referência dados pelo método de absorção atómica e os resultados dados pelo programa do XRF, *PANalytical Minipal/MiniMate v.6.0.B*, são recolhidos e as diferenças, o seu desvio padrão e desvio padrão relativo (RSD(r)) são calculadas num ficheiro de Excel. Escolhem-se os melhores pontos para formar a curva de calibração e colocam-se no programa estatístico da Nestlé, *ESTER/QSTAT.Net*, versão 4.4.7.816. Este programa usa a estatística robusta para o processamento dos resultados e compara-os com a estatística clássica.

#### **• VANTAGENS DA UTILIZAÇÃO DA ESTATÍSTICA ROBUSTA**

Os métodos usando a estatística robusta são pouco afectados pelos pontos fora dos limites aceitáveis, os chamados "outliers". Na estatística clássica, quando há valores aberrantes presentes, o método tem uma baixa performance.

A estatística robusta substitui a distribuição normal dos métodos clássicos pela distribuição t de Student, com baixo grau de liberdade. Assim o desvio associado à distribuição normal deixa de existir. Por outro lado, a estatística robusta usa a mediana em vez da média, que tem vantagens porque é pouco influenciada por valores aberrantes [37,38].

A utilização da estatística clássica conjuntamente com a estatística robusta torna-se vantajosa e dá informação muito útil [35], situação que se verifica no Q-STAT.

A forma como se calcula o desvio padrão, desvio padrão relativo da repetibilidade e desvio padrão da reprodutibilidade intermédia (SD(iR)) é diferente para a estatística clássica e para a estatística robusta. Para a calibração do aparelho consideraram-se somente os valores de estatística robusta. As fórmulas de cálculo são representadas na tabela em seguida:



Tabela 3 - Cálculo do desvio padrão da repetibilidade

	Estatística Clássica	Estatística Robusta
2 Replicados	$SD(r) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n SD_i^2}{n}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_{i1} - x_{i2})^2}{2n}}$	$SD_{rob}(r) = 1.0484 \times \text{Med}_{i=1, \dots, n} \{  x_{i1} - x_{i2}  \}$
3 Replicados	$SD(r) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n SD_i^2}{n}}$	$SD_{rob}(r) = 1.2011 \times \text{Med}_{i=1, \dots, n} \{ SD_i \}$

Legenda: n, número de determinações (simples ou em duplicado); k, número de replicados ; Med{ $x_i$ }, mediana do conjunto de resultados { $x_i$ };  $x_i$  (ou  $x_j$ ), resultado individual incluído no conjunto de determinações, estando i (j) entre 1 e n;  $\bar{x}$ , média do conjunto de valores { $x_i$ };  $x_{i1}$  e  $x_{i2}$ , dois resultados do conjunto de replicados, estando i entre 1 e n;  $SD_i$ , desvio padrão do conjunto de replicados, variando o i entre 1 e n.

Para a reprodutibilidade e desvio padrão da reprodutibilidade intermédia usam-se as fórmulas da tabela 4:

Tabela 4 - Fórmulas de cálculo do desvio padrão da reprodutibilidade (intermédia)

	Estatística Clássica	Estatística Robusta
1 Replicado	$SD(iR) = SD\{x_i\} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$	$SD_{rob}(r) = 1.1926 \times \text{Med}_{i,j=1, \dots, n; i \neq j} \{ \text{Med}_{i,j} \{  x_i - x_j  \} \}$
2 Replicados	$SD(iR) = \sqrt{SD^2(b) + \frac{1}{2} \times SD^2(r)}$	$SD_{rob}(iR) = \sqrt{SD_{rob}^2(b) + \frac{1}{2} \times SD_{rob}^2(r)}$
3 ou mais Replicados	$SD(iR) = \sqrt{SD^2(b) + \frac{k-1}{k} \times SD^2(r)}$	$SD_{rob}(iR) = \sqrt{SD_{rob}^2(b) + \frac{k-1}{k} \times SD_{rob}^2(r)}$

Legenda: SD (b), desvio padrão entre as medianas dos replicados e  $SD_{rob}(b)$ , desvio padrão robusto entre as médias dos replicados; SD(r) ou  $SD_{rob}(r)$ , desvios padrões da repetibilidade calculada de acordo com a tabela 3.

## 2.2. VALIDAÇÃO DO MÉTODO

### 2.2.1. PRINCÍPIOS DA VALIDAÇÃO

O objectivo da validação é estabelecer uma previsão da performance real do modelo de calibração e assegurar que se ajusta ao que se pretende. Os parâmetros mais importantes que se verificam são a veracidade e a precisão. Também se determina o valor do SEP (“Standard Error of Prediction” ou desvio padrão de previsão).

#### • VERACIDADE

A Veracidade relaciona-se com diferença (“Bias”). A análise da veracidade do método alternativo é feita analisando várias amostras pelo método alternativo e pelo método de referência, de modo a verificar a presença de uma diferença sistemática ou uma diferença proporcional.

De acordo com a gama de concentração das amostras de validação, aplica-se uma fórmula de cálculo para se verificar se se pode considerar a diferença proporcional:

$$\frac{Máx - Min}{Máx} \times 100$$

Se o valor for inferior a 20% consideram-se somente os resultados de análise das diferenças (diferença sistemática). Se o valor for superior a 20% consideram-se os resultados da análise das diferenças (diferença sistemática) e da análise de regressão (diferença proporcional).

A “diferença sistemática” é detectada fazendo uma análise das diferenças das médias de todos os valores de referência e todos os valores alternativos, como podemos ver na figura abaixo.

	VALORES ALTERNATIVOS				VALORES DE REFERÊNCIA			DIFERENÇAS
	REP.1	REP.2	REP.3	MÉDIA	REP.1	REP.2	MÉDIA	
Amostra 1								
Amostra 2								
Amostra 3								
Amostra 4								
Amostra 5								
...								
Amostra 25								

Fig. 14 - Modo de verificar a presença de uma diferença sistemática.

A presença de uma “diferença sistemática” significa que a diferença entre os valores obtidos em ambos os métodos é constante durante a gama de concentração considerada.

A “diferença proporcional” é detectada fazendo uma análise da regressão em que se comparam as médias do método alternativo e do método de referência, como é evidenciado na figura seguinte:

	MÉDIA MÉTODO REF.	MÉDIA MÉTODO ALT.
Amostra 1		
Amostra 2		
Amostra 3		
Amostra 4		
Amostra 5		
...		
Amostra 25		

Fig. 15 - Modo de verificar a presença de uma diferença proporcional.

A presença de uma diferença proporcional significa que a diferença entre os valores obtidos com ambos os métodos se altera com a concentração, podendo ser proporcional ou não.

## • PRECISÃO

A Precisão tem a ver com repetibilidade, dispersão dos resultados e desvio padrão. Quanto maior for o desvio padrão menor será a precisão.

A gama de validação deve estar incluída na gama de calibração e as amostras que se usarem na validação devem cobrir 95% da gama de calibração.

## **2.2.2. PROCESSAMENTO ESTATÍSTICO DOS RESULTADOS DE VALIDAÇÃO**

Os dados recolhidos durante a fase de validação do método são alvo de um processamento estatístico no Q-STAT. No que toca à precisão, é determinado o desvio padrão, o coeficiente de variação, a repetibilidade e a reprodutibilidade intermédia das amostras.

Todos os resultados são registados num ficheiro de validação e são alvo de uma análise minuciosa por especialistas do Nestlé Research Centre (NRC), Suíça, para verificar se estão de acordo com os critérios de aceitação.

## **2.3. MONITORIZAÇÃO DO MÉTODO**

### **2.3.1. PRINCÍPIOS DA MONITORIZAÇÃO**

Os laboratórios são responsáveis pela Qualidade dos seus resultados analíticos. Assim, depois de a calibração estar concluída é necessário a sua verificação e monitorização frequente, tanto do modelo de calibração, como do aparelho, de forma a provar que a performance do modelo de calibração, definida durante a fase de validação, ainda é válida para a análise rotineira dos produtos que estão a ser produzidos.

Em cada processo produtivo, independentemente de estar bem desenhado e controlado, uma determinada quantidade de variáveis naturais ocorrem. Um processo que opere somente com causas de variação naturais diz-se que está num estado de controlo estatístico, ou mais sucintamente, sob controlo. Outros tipos de variabilidade podem ocorrer frequentemente - máquinas com problemas de afinação, erros de operador, matérias-primas com defeito – e são designadas por causas de variação imputável.

A monitorização serve para controlar estatisticamente o processo para saber se ocorrem desvios aos limites aceitáveis durante o processo produtivo, ao longo do tempo. Com uma carta de controlo implementada, podem prever-se desvios aos limites aceitáveis e problemas iminentes antes que surjam problemas visíveis, isto é, antes que produtos fora de normas sejam produzidos. Além de controlar o processo também permite diminuir a variabilidade ao longo do tempo, com a aplicação das medidas correctivas que se considerarem necessárias para reduzir ou eliminar as causas ou a fonte de variação.

Para o controlo da quantidade de cálcio e ferro dos produtos de nutrição infantil vai-se adoptar uma carta de controlo de variáveis com CUSUM, que dá muito mais informações acerca da origem do erro do que uma carta de controlo de atributos.

## 2.3.2. PROCESSAMENTO ESTATÍSTICO DO APARELHO MINIPAL E DA CALIBRAÇÃO

Usam-se as cartas de controlo do módulo de Monitorização do Q-Stat para controlar o aparelho XRF e a calibração. Em cada um dos casos avalia-se a precisão e a veracidade do método. A monitorização é feita sempre que houver amostras disponíveis de produto terminado e aplica-se a todos os produtos de nutrição infantil.

## 2.3.3. MONITORIZAÇÃO DO XRF

Para a monitorização do XRF usam-se 2 amostras, uma de concentração elevada e outra de concentração baixa de cálcio e de ferro, utilizadas na validação do método. Faz-se a análise em duplicado no XRF, durante pelo menos 6 dias e determina-se o valor de  $SD(r)$  e  $SD(iR)$  no programa Q-Stat.

Para a veracidade determinam-se os limites de monitorização segundo as seguintes fórmulas:

$$\text{Limites de Controlo} = \text{Ref} \pm 2,578 \times \sqrt{SD^2(iR) - 0,5 \times SD^2(r)}$$

$$\text{Limites de Perigo} = \text{Ref} \pm 1,97 \times \sqrt{SD^2(iR) - 0,5 \times SD^2(r)}$$

Para a precisão determinam-se os limites de monitorização de acordo com as fórmulas seguintes:

$$\text{Limites de Controlo} = 3,643 \times SD(r) \text{ ou } CV(r)$$

$$\text{Limites de Perigo} = 2,772 \times SD(r) \text{ ou } CV(r)$$

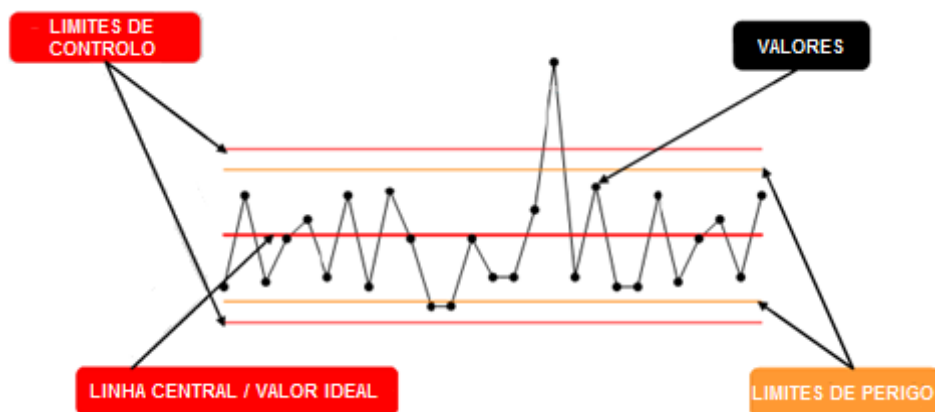


Fig. 16 - Limites de controlo de uma carta de controlo simples.

O uso de mais ou menos 3 vezes o desvio padrão para determinar os limites de controlo e os limites de perigo justifica-se por dar bons resultados na prática.

Os limites de controlo são definidos nas cartas de controlo, tal como mostrado na figura 16.

Complementarmente a esse controlo, o Q-STAT também define adicionalmente os limites de CUSUM (“Cumulative Sum”). O CUSUM detecta pequenos desvios permanentes, que não são detectados pelas cartas de controlo simples, pois estas são apenas eficientes na detecção de desvios maiores. O CUSUM é composto por duas partes, alto e baixo. O CUSUM Alto acumula as diferenças positivas, enquanto que o CUSUM Baixo acumula as diferenças negativas.

Quanto maior for o tamanho da amostragem, maior será a capacidade de resposta da carta de controlo em detectar um desvio de pequena amplitude.

Para a monitorização da calibração, os limites de CUSUM são calculados da seguinte forma:

$$CUSUM = 0 \pm 5 \times \sqrt{SD^2(R)} - 0,5 \times SD^2(r)$$

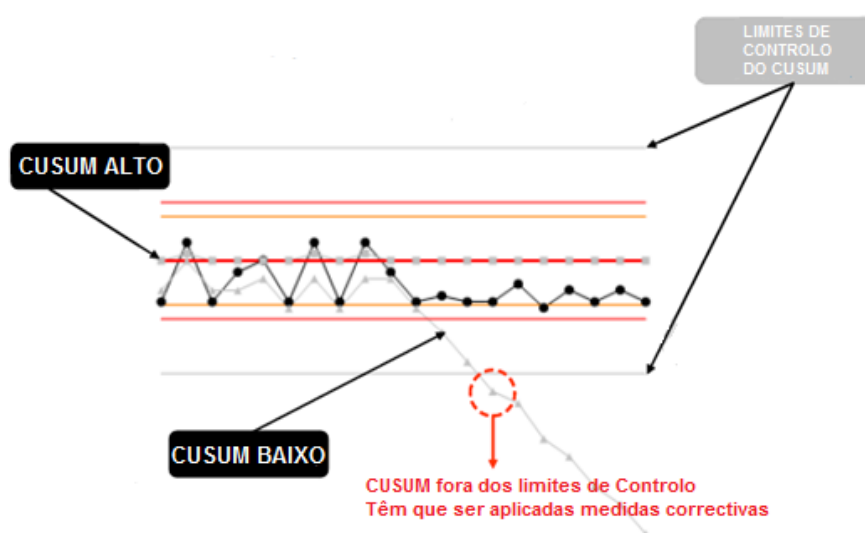


Fig. 17 - Limites CUSUM

Se o método estiver fora de controlo têm que se implementar medidas correctivas: uma manutenção do aparelho de XRF pode ser necessária, pode-se ter que fazer um ajuste à calibração ou revalidar o modelo de calibração.

Depois de se fazerem as medidas correctivas o CUSUM tem que ser levado a zero para não introduzir erros nas análises futuras.

### 2.3.3. MONITORIZAÇÃO DA CALIBRAÇÃO

Para a monitorizar a calibração, usam-se as amostras diárias da produção e usam-se ambos os métodos de referência e alternativo para obter um conjunto de

valores em duplicado. O processamento estatístico usando o Q-Stat dá o valor de desvio padrão da repetibilidade do método de referência, o desvio padrão da repetibilidade do método alternativo e o desvio padrão das diferenças.

Para a veracidade determinam-se os limites de monitorização segundo as seguintes fórmulas:

$$\text{Limites de Controlo} = \text{Ref.} \pm 2,578 \times SD(d)$$

$$\text{Limites de Perigo} = \text{Ref.} \pm 1,96 \times SD(d)$$

Para a precisão determinam-se os limites de monitorização de acordo com as fórmulas seguintes:

$$\text{Limites de Controlo} = 3,643 \times SD(r) \text{ ou } CV(r)$$

$$\text{Limites de Perigo} = 2,772 \times SD(r) \text{ ou } CV(r)$$

Para a monitorização da calibração, os limites de CUSUM são calculados da seguinte forma:

$$CUSUM = 0 \pm 5 SD(d)$$

No caso de o método estar fora de controlo deve-se verificar a monitorização do método, deve-se verificar a integridade do aparelho e se necessário deve-se fazer uma manutenção ou então revalidar o modelo de calibração.

Uma carta de controlo pode indicar uma situação fora de controlo, quando um ou mais pontos surgem fora dos limites de controlo ou quando os pontos exibem um padrão de comportamento que não é semelhante ao mostrado na figura em baixo:

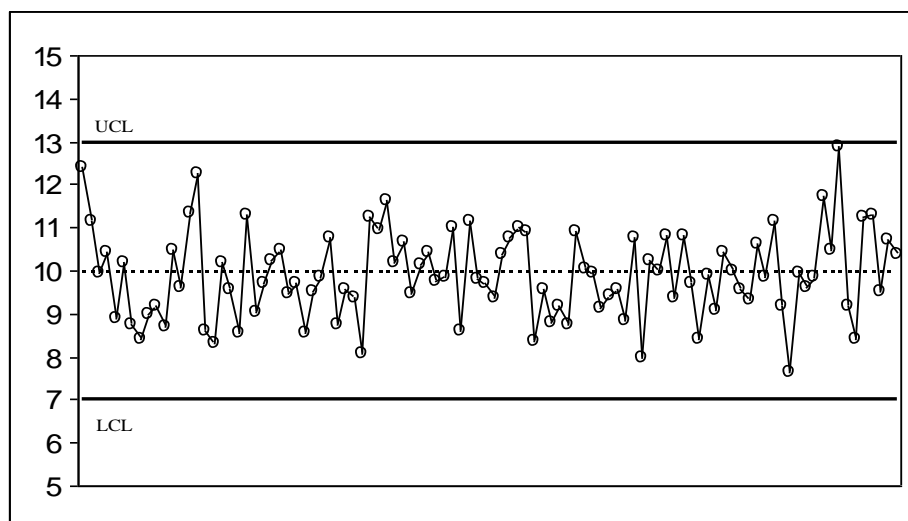


Fig. 18 – Comportamento ideal para as amostras de uma carta de controlo. (Retirado da instrução técnica da Nestlé, "Statistical Process Control (SPC) Technical Concepts and Calculations")

Como se pode verificar, existe uma variação alternada ao longo da linha central. Todo o processo que não tenha um comportamento como o observado na figura acima, depois de um determinado tempo de produção, requer uma investigação e a implementação de acções correctivas. A identificação de comportamentos discrepantes e a aceitação de pontos fora dos limites de controlo requer muita experiência e conhecimento do processo.



# **CAPÍTULO 3**

## **PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

Todas as metodologias que irei descrever em seguida são descritas de forma detalhada para permitir que um analista ou investigador possa reproduzir na íntegra todas as condições de trabalho.

### **3.1. MÉTODO DE REFERÊNCIA – ABSORÇÃO ATÔMICA**

- **DIVISÃO DAS AMOSTRAS PARA CALIBRAÇÃO**

Para a calibração do aparelho de Fluorescência por Raio-X tive diariamente à minha disposição um conjunto de várias amostras que chegaram ao laboratório Físico-Químico, à Microbiologia e Degustação, todas provenientes do sector de produção de produtos de Nutrição Infantil, cereais de pequeno-almoço e cereais para toda a família.

Os produtos usados têm diferentes características em termos de matriz. A principal característica que os diferencia é a presença ou ausência de leite. Nos produtos com leite incluem-se a gama das Farinhas Lácteas simples, e Farinhas com maçã, Pêra, Banana, Banana e Laranja e vários Frutos. Nos produtos não lácteos incluem-se as Farinhas não lácteas simples, com mel, com frutos e com Cacau.

A criação de modelos de calibração baseou-se nesta característica principal mas outras variáveis também foram tidas em conta, como a presença frutos desidratados e a presença de cacau na sua fórmula.

Assim, a idealização dos modelos de Calibração baseou-se nestas três diferenças. Cada conjunto de amostras referidas anteriormente foi separado nos três grupos seguintes:

- Modelo 1: Farinhas Lácteas com ou sem frutos
- Modelo 2: Farinhas Não Lácteas com frutos ou mel
- Modelo 3: Farinhas Não Lácteas com Cacau

Mais tarde verificaram-se as curvas de calibração para detectar se algum conjunto de amostras contribuía para o desvio à linearidade da curva.

## • ADIÇÃO DE INGREDIENTES À BASE DE PRODUTO

Para se preparar um conjunto de amostras especiais com diferentes teores de cálcio e ferro recolhe-se uma amostra de base de produto de nutrição infantil directamente da linha de produção. Posteriormente adicionam-se os restantes ingredientes, nas quantidades representadas na tabela 5 da página seguinte.

Tabela 5 - Quantidades necessárias, em gramas, para produzir um produto de acordo com a especificação.

Produtos de Nutrição Infantil	Base (g)	Leite em pó	Premix de Vitaminas	Aroma Vanilina	Malto-dextrina	Flocos de várias Frutas
Farinha Láctea Simples	1525,24	416,00	2,30	0,40	70,00	---
Farinha Láctea com Frutos	1116,50	438,00	7,00	0,40	---	320,00
Farinha Não Láctea Simples	1947,16	---	1,94	0,40	---	---
Farinha Não Láctea com Mel <sup>(a)</sup>	1948,16	---	1,94	0,40	---	---
Farinha Não Láctea com Frutos	1689,08	---	---	0,80	---	260,00
Farinha Não Láctea com Cacau <sup>(a)</sup>	1946,88	---	1,92	0,40	---	---

(a) - A base já contém mel ou cacau.

### 3.1.1. PROCEDIMENTO DE PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS ESPECIAIS

As amostras comerciais de referência contêm concentrações de cálcio de 390 a 440 mg/100g nas Farinhas Lácteas e de 140 a 200 mg/100g nas Farinhas não Lácteas. No caso do ferro a concentração nas farinhas lácteas é de cerca de 7.5 mg/100g e nas farinhas não lácteas entre 5 e 7 mg/100g.

Para preparar as amostras com cálcio e ferro adicionados, para as curvas de calibração, utilizou-se Carbonato de Cálcio natural seco ( $\text{CaCO}_3$ , concentração 98g/100g) ou Fumarato Ferroso ( $\text{C}_4\text{H}_2\text{FeO}_4$ , concentração 97g/100g), de grau alimentar.

Procedeu-se ao cálculo das quantidades a adicionar a cada produto para obter concentrações 10 vezes abaixo do limite inferior aos valores de referência e até 30% mais altos aos valores de referência. Desta forma teve-se um conjunto de amostras adequadas para obter uma curva de calibração com uma gama de concentração alargada.

O procedimento foi o seguinte:

1. Recolheu-se uma quantidade suficiente de base directamente da linha de produção, no próprio dia da formação das amostras especiais.

2. Usando o moinho, moeu-se a amostra de base a 5000rpm, durante 25 segundos.
3. Pesaram-se todos os ingredientes de acordo com a tabela 5.
4. Transferiu-se o preparado para a cuba metálica do homogeneizador. Ligou-se durante 15 minutos na velocidade 2, para homogeneizar bem a amostra.
5. Desligou-se o homogeneizador, levantou-se o batedor e espalharam-se as quantidades entretanto pesadas sobre a amostra homogeneizada.

A tabela 6 apresenta as quantidades de carbonato de cálcio e fumarato ferroso adicionadas, para a preparação da amostra de menor concentração, para cada um dos tipos de produto. Outras adições foram feitas, até um limite 30% superior ao valor de referência de forma a obter uma curva de calibração com uma distribuição uniforme de pontos em todo o intervalo de concentração.

*Tabela 6 - Quantidades de carbonato de cálcio e fumarato ferroso adicionadas, em gramas, para a formação de cada amostra especial.*

	<b>Fumarato Ferroso</b>	<b>Carbonato de Cálcio</b>
Farinha Láctea Simples	0,046	0,720
Farinha Láctea com Frutos	0,380	0,700
Farinha Não Láctea Simples	0,194	0,848
Farinha Não Láctea com Mel	0,194	0,748
Farinha Não Láctea com Frutos	0,194	0,748
Farinha Não Láctea com Cacau	0,192	0,880

6. Voltou-se a ligar o homogeneizador por mais 5 minutos.
7. Decorrido esse tempo, desligou-se o homogeneizador e retiraram-se 100 gramas para uma saqueta metálica devidamente identificada.
8. Todas as saquetas metálicas foram seladas termicamente e guardadas até posterior utilização.
9. Em todas as amostras especiais foi realizado o doseamento de cálcio e ferro por absorção atômica para determinar os valores da concentração.

## **• RECOLHA, MOAGEM E ARMAZENAMENTO DE AMOSTRAS**

As amostras recolhidas e produzidas de produto terminado e especiais foram moídas e colocadas em saquetas de alumínio, seladas termicamente e identificadas com o lote e a hora. Durante os dias da análise, as amostras foram seladas em sacos metálicos e colocadas num excicador.

## **• REAGENTES E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS**

- Óxido de Lantânio III ( $\text{La}_2\text{O}_3$ ) Merck, Ref.110982
- Ácido Nítrico Concentrado (65%) Merck, Ref.100443
- Solução Padrão de Cálcio Merck 1000mg ( $\text{CaCl}_2$  em 6,5% HCl) Titrisol, Ref.109943
- Solução Padrão de Ferro Merck 1000mg ( $\text{FeCl}_3$  em 15% HCl) Titrisol, Ref.109972
- Ácido Nítrico 65% (v/v) Merck, Ref.100443
- Peróxido de hidrogénio (30%) Merck, Ref. 107209
  
- Água ultra-filtrada 18,2 MΩ
  
- Balança Mettler Toledo AE200, Precisão 0,0001g
- Balança Mettler Toledo PG2002-S, Precisão 0,01g
- Moinho Retsch Grindomix GM200
- Homogeneizadora de bancada Hobart N50-G
- Banho mgw LAUDA RM20
- Aparelho de microondas MLS-1200
- Aparelho de Absorção Atómica Philips Pye Unicam 30

### **3.1.2. PROTOCOLO DE ABSORÇÃO ATÓMICA**

#### **a) Preparação de Soluções**

##### **- Preparação da Solução de Lantânio 5% (m/v)**

1. Pesaram-se 58,6 gramas de Óxido de Lantânio III e transferiram-se para um balão volumétrico de 1L;

2. Adicionaram-se 200 ml de água ultra-filtrada e agitou-se lentamente o balão até uma homogeneização completa;

3. Adicionaram-se cuidadosamente 250 ml de Ácido nítrico 65% (v/v). Agitou-se lentamente para dissolver e deixou-se em repouso a arrefecer;

4. Arrefeceu-se num banho a 20°C, e perfez-se com água ultra-filtrada. Transferiu-se no final a solução para uma garrafa de polietileno.

**- Preparação de Solução Mãe de Cálcio, 100 µg/ml**

1. Pipetaram-se 5 ml de uma solução padrão de cálcio Merck, para um balão volumétrico de 50 ml;

2. Aferiu-se o balão com água ultra-filtrada e agitou-se para homogeneização completa.

**- Preparação da Solução Mãe, 100 µg/ml**

1. Pipetaram-se 5 ml de uma solução padrão de Ferro para um balão volumétrico de 50 ml;

2. Aferiu-se com água ultra-filtrada e agitou-se para homogeneização completa;

**- Preparação das soluções de calibração de Ferro 0 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 3 µg/ml, 4 µg/ml e 5 µg/ml**

1. Dosearam-se 10 ml de Ácido Nítrico 65% (v/v) para seis balões volumétricos de 100 ml (1 a 6), Aos balões 2 a 6, foi adicionado, respectivamente, 1, 2, 3, 4 e 5 ml de solução mãe de Ferro. No primeiro balão não se adicionou solução mãe de Ferro;

2. Aferiram-se os balões com água ultra-filtrada e agitaram-se para homogeneização completa. Obtiveram-se 6 soluções padrão com concentração de 0, 1, 2, 3, 4 e 5 µg/ml de ferro.

**- Preparação das soluções de calibração de cálcio 0 µg/ml, 1 µg/ml, 2 µg/ml, 3 µg/ml, 4 µg/ml e 5 µg/ml**

1. Pipetaram-se para seis balões volumétricos 5 ml de Lantânio de 100 ml (1 a 6). Aos balões 2 a 6, foram adicionados respectivamente, 1, 2, 3, 4 e 5 ml de solução mãe de Cálcio. No primeiro balão não se adicionou solução mãe de Cálcio;

2. Aferiram-se os balões com água ultra-filtrada e agitaram-se para homogeneização completa. Obtiveram-se 6 soluções padrão com concentração de 0, 1, 2, 3, 4 e 5 µg/ml de Cálcio.

## **PREPARAÇÃO DE AMOSTRAS PARA ABSORÇÃO ATÔMICA**

As amostras foram digeridas por microondas com ácido nítrico.

**- Digestão com ácido nítrico**

1. Abriu-se uma saqueta de uma amostra armazenada.

2. Antes da pesagem procedeu-se à calibração da balança;

3. Usaram-se 2 vasos de Tetrafluormetaxil (TFM) para cada amostra (duplicado). Pesou-se aproximadamente 1 grama para cada vaso.

4. Levaram-se os vasos para a câmara de exaustão e adicionou-se a cada um deles 5 ml de ácido nítrico 65% (v/v) e 0,5 ml de peróxido de hidrogénio 30%.

5. Colocaram-se os vasos em cada suporte e apertaram-se usando uma chave dinamométrica com uma pressão de 22,5 Nm, até se ouvir um clique.

6. De seguida colocaram-se os 10 suportes com os vasos no rotor do aparelho de microondas MLS-1200 e procedeu-se à digestão ácida das amostras, durante 25 minutos. O programa que foi usado está descrito na tabela seguinte:

*Tabela 7 - Programa usado na digestão das amostras*

Passo	Potência das Microondas (W)	Tempo (minutos)
1	250	1
2	0	2
3	250	5
4	400	5
5	500	5
6	0	5

7. Depois de a digestão acabar, os vasos foram retirados do rotor do aparelho de microondas, foram levados outra vez para a câmara de exaustão e esperaram-se 15 minutos para que os vasos arrefecessem. Este passo é importante para evitar a libertação excessiva de pressão de dentro dos tubos, com a consequente projecção e perda de amostra.

8. Abriram-se os vasos com a chave dinamométrica e, com o auxílio de um funil de vidro, transferiu-se o conteúdo dos vasos para balões de 50 ml.

9. Com um esguicho enxaguaram-se cuidadosamente as tampas e o interior dos vasos com água ultra-filtrada e transferiram-se para os balões de 50 ml. Por fim passou-se água ultra-filtrada pelo funil.

10. Aferiram-se os balões com água ultra-filtrada e agitaram-se para homogeneização completa (solução digerida).

## • PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE DE FERRO

Para análise do ferro a análise é feita de forma directa, sem diluição da solução digerida.

## • PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE DE CÁLCIO

Para análise do cálcio é necessário fazer uma diluição das amostras. Foi estabelecido que para amostras de produtos de nutrição infantil com leite na sua constituição, o factor de diluição deve ser 20. Para produtos sem leite, este factor deve ser 10. As amostras assim diluídas, ficam com uma concentração intermédia aos limites de calibração.

1. No caso das soluções digeridas das farinhas lácteas pipetaram-se 5 ml para um balão volumétrico de 100 ml. No caso das farinhas não lácteas, devem ser pipetados 10 ml.

2. Adicionaram-se 5 ml de solução de Lantânio 5% (v/v) preparada anteriormente. A solução de lantânio serve para suprimir os efeitos da interferência do fósforo no sinal do cálcio.

3. Aferiu-se com água ultra-filtrada.



### 3.1.3. DOSEAMENTO DE CÁLCIO E FERRO POR ABSORÇÃO ATÔMICA

- **ESTABILIZAÇÃO E AJUSTE DO APARELHO**

1. Ligou-se o espectrofotômetro de absorção atômica *Philips Pye Unicam 30* minutos antes da análise, para alcançar a estabilidade electrónica.
2. Fizeram-se os ajustes necessários para maximizar a sensibilidade da chama. Verificou-se o alinhamento do queimador.
3. Configurou-se o equipamento de acordo com a análise que se iria realizar.
4. Definiram-se as condições do programa no integrador, de acordo com a tabela seguinte:

*Tabela 8 - Condições do programa do integrador*

INTEGRAÇÃO OU TEMPO DO PICO	5 segundos
NÚMERO DE LEITURAS	3
CONCENTRAÇÃO DO PADRÃO MAIS ALTO	5.000
NÚMERO DA PRIMEIRA AMOSTRA	0
NÚMERO DO PROGRAMA	5

- **PREPARAÇÃO DO APARELHO PARA DOSEAMENTO DO FERRO**

1. Colocou-se a lâmpada de cátodo do ferro em posição, ajustou-se o comprimento de onda para os 248,3 nm e o nível de absorção de energia do feixe para 80% da energia máxima recomendada.
2. Ligou-se o ruído de fundo (“Background”) e a lâmpada de Deutério do aparelho.
3. Após 20 minutos abriu-se o gás combustível (acetileno) e o gás comburente (ar) e ligou-se a chama do aparelho.

4. Deixou-se estabilizar a chama durante 15 minutos.

### • CONSTRUÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DO FERRO

1. Mergulhou-se o capilar do nebulizador no balão da solução padrão nº1 de ferro. Fez-se “autozero” ao aparelho.
2. De seguida mergulhou-se o capilar do nebulizador em cada solução de calibração, começando pela de mais baixa concentração e registou-se o valor da absorvância. O desvio padrão relativo aceitável na leitura dos padrões foi no máximo 1,0. No caso de se obterem registos mais altos efectuou-se uma nova leitura.
3. Com o valor de absorvância obtido faz-se um gráfico em que se coloca no eixo das abcissas a concentração do padrão em  $\mu\text{g/ml}$  e no eixo das ordenadas a absorvância. De seguida traça-se a curva de calibração e verifica-se se a sua linearidade está próxima de 1. A figura 17 apresenta um exemplo da curva de calibração para o ferro.

Figura 17 – Curva de calibração para o ferro obtida por absorção atômica.

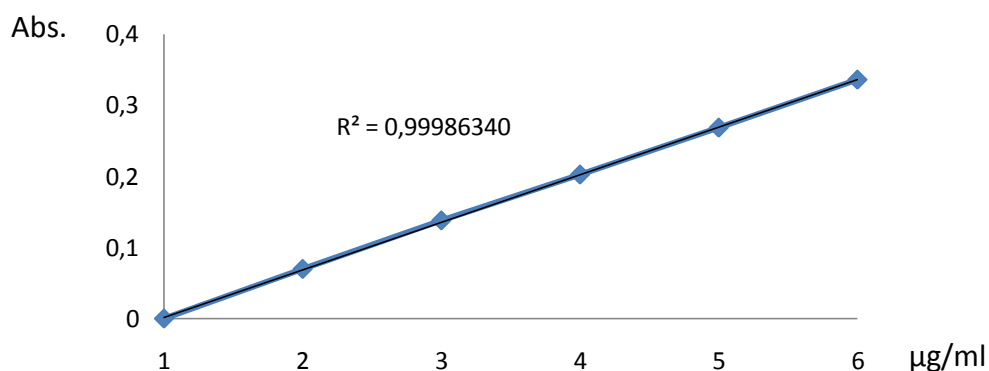


Tabela 9 – Resultados de concentração obtidos para os padrões de ferro.

Padrão Ferro	Concentração ( $\mu\text{g/ml}$ )	RSD (r) %
1	0,000	—
2	0,070	1,0
3	0,138	0,7
4	0,203	0,9
5	0,269	0,7
6	0,336	0,8

## • DOSEAMENTO DO FERRO NAS AMOSTRAS

1. Mergulhou-se o tubo de aspiração do espectrofotómetro em cada balão de 50ml, fez-se uma leitura em triplicado e registou-se o valor da concentração média, em  $\mu\text{g/ml}$ . Controlou-se o desvio padrão durante as leituras e no caso de o desvio ser superior a 2,8, voltou-se a repetir a leitura.
2. Durante as leituras, em intervalos regulares (4 leituras) verificou-se a ocorrência de desvio superior a 5% em relação às concentrações dos padrões. Para isso fez-se a leitura do padrão da gama de concentração que se estava a operar. No caso de o desvio ser superior a 5%, fez-se o reajuste do zero, fazendo um “autozero” do padrão 1 (0  $\mu\text{g/ml}$ ) e de seguida voltou-se a ler o padrão da gama de concentração em que se estava a operar e verificou-se se a concentração estava próxima do valor de concentração do padrão. Alternativamente, voltou-se a construir uma nova curva de calibração. Em ambos os casos tem que se repetir as leituras desde o último ajuste da curva.

## • PREPARAÇÃO DO APARELHO PARA DOSEAMENTO DO CÁLCIO

1. Com a chama do aparelho ligada, colocou-se a lâmpada de cátodo do cálcio em posição, ajustou-se o comprimento de onda para os 422,7 nm e o nível de absorção de energia do feixe para 80% da energia máxima recomendada.
2. Desligou-se o ruído de fundo (“Background”) e a lâmpada de Deutério do aparelho. Esta lâmpada não pode ser usada para o cálcio pois não funciona para comprimentos de onda superiores a 340 nm.
3. Deixou-se estabilizar a chama por mais 15 minutos.

## • CONSTRUÇÃO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO DO CÁLCIO

1. Mergulhou-se o tubo de aspiração no balão do padrão 1 (0  $\mu\text{g/ml}$ ) de cálcio. Fez-se “autozero” ao aparelho.
2. De seguida mergulhou-se o tubo de aspiração em cada solução de calibração, começando pela de mais baixa concentração e registou-se o valor da absorvância. Controlou-se o desvio padrão relativo o mais baixo possível e no caso de se obterem valores demasiado altos (próximos de 2,8) repetiu-se a leitura do padrão.

3. Com o valor de absorvância obtido fez-se um gráfico em que se colocou no eixo das abcissas a concentração do padrão em  $\mu\text{g/ml}$  e no eixo das ordenadas a absorvância. De seguida traçou-se a curva de calibração e verificou-se se a sua linearidade estava próxima de 1. A figura 18 apresenta um exemplo da curva de calibração para o cálcio.

Figura 18 - Curva de calibração para o cálcio obtida por absorção atómica.

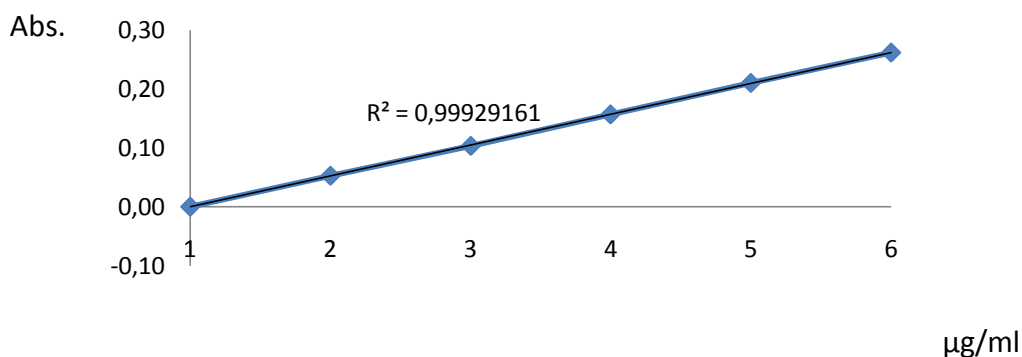


Tabela 10 – Resultados de concentração obtida para os padrões de cálcio.

Padrão Cálcio	Concentração ( $\mu\text{g/ml}$ )	RSD (r) %
1	0,000	—
2	0,053	0.2
3	0,104	0.3
4	0,157	0.1
5	0,210	0.3
6	0,262	0.0

## • DOSEAMENTO DO CÁLCIO NAS AMOSTRAS

1. Mergulhou-se o tubo de aspiração do espectrofotómetro em cada balão de 100ml, fez-se uma leitura em triplicado e registou-se o valor da concentração média. Controlou-se o desvio padrão durante as leituras e no caso de o desvio ser superior a 2,8, voltou-se a repetir a leitura.

2. Durante as leituras, em intervalos regulares (4 leituras) verificou-se a ocorrência de desvio superior a 5% em relação às concentrações dos padrões. Para isso fez-se a leitura do padrão da gama de concentração que se está a operar. No caso de o desvio ser superior a 5%, procedeu-se ao reajuste do zero, fazendo um “autozero” do padrão 1 e de seguida voltou-se a ler o padrão da gama de concentração em que se estava a operar e verificou-se se a concentração estava próxima do valor de concentração do

padrão. Em alternativa, voltou-se a construir uma nova curva de calibração. Em ambos os casos tem que se repetir as leituras desde o último ajuste da curva.

### **3.1.4. CÁLCULO DA QUANTIDADE DE FERRO E CÁLCIO EM mg/100g**

Foram analisadas 371 amostras, 167 do grupo 1, 87 do grupo 2 e 117 do grupo 3, em duplicado. Durante o doseamento das amostras por absorção atômica controlou-se o desvio padrão relativo da repetibilidade abaixo dos 2,8%. Foram calculadas as concentrações em mg/100g a partir dos valores de absorvância dados pelo aparelho, pela fórmula seguinte:

$$[\text{Concentração}] = \frac{[(C \times D) - B] \times V}{M \times 10}$$

Sendo

C – A concentração de Cálcio e Ferro obtida, em µg/ml

D – Factor de diluição

B – Concentração do branco, 0,031 µg/ml

V – Volume da solução inicial sem diluição (50ml)

M – Toma do produto, em gramas

10 – Factor de conversão de µg/ml para mg/100g.

Depois de se terem realizado os cálculos devidos, segundo a fórmula anterior, os resultados foram expressos em mg/100g, com três algarismos para o cálcio e duas casas decimais para o ferro.

### **• PROCESSAMENTO ESTATÍSTICO DOS RESULTADOS**

Determinou-se a média, o desvio padrão e o desvio padrão relativo dos replicados. O desvio padrão relativo deve ser inferior a 4% para o cálcio e para o ferro deve ser inferior a 6%. O processamento estatístico dos resultados está registado nas tabelas 69,70 e 71, em anexo.

### 3.1.5. RESULTADOS DE CONCENTRAÇÃO (mg/100g) DE AMOSTRAS ESPECIAIS

Nas tabelas seguintes (9 a 14) estão representadas as grelhas de cálculo das concentrações de cálcio e ferro, para cada produto.

*Tabela 9 - Resultados de concentração para a farinha Láctea Simples.*

Amostra	Concentração obtida (mg/100g)	
	Cálcio	Ferro
CS_Base	107	1,10
CS_A1 (2)	360	1,00
CS_A2	363	1,84
CS_A3	373	2,73
CS_A4	375	3,53
CS_A5	383	4,68
CS_A6	390	4,85
CS_A7	394	5,53
CS_A8	397	6,79
CS_A9	422	9,69
CS_A10	437	11,22
CS_A11	469	14,58
CS_A12	488	15,54
CS_A14	534	19,18
CS_A15	564	19,69
CS_A16	575	22,86

*Tabela 10 - Resultados de concentração para a Farinha Láctea com Frutos.*

Amostra	Concentração obtida (mg/100g)	
	Cálcio	Ferro
C5F_Base	55	0,83
C5F_A1	326	1,02
C5F_A2	330	1,28
C5F_A4	344	2,70
C5F_A6	363	4,29
C5F_A8	379	5,80
C5F_A9	382	6,62
C5F_A10	389	7,39
C5F_A11	404	9,49
C5F_A12	422	10,47
C5F_A13	447	11,46
C5F_A14	448	12,63
C5F_A16	494	15,33
C5F_A18	515	18,35
C5F_A18.5	524	19,31
C5F_A19	542	20,48
C5F_A19.5	548	21,76
C5F_A20	551	23,95
C5F_A20.5	553	26,26
C5F_A21	604	28,22

*Tabela 11- Resultados de concentração para a Farinha não Láctea Simples.*

Amostra	Concentração obtida (mg/100g)	
	<b>Cálcio</b>	<b>Ferro</b>
N5C_A1	47	2,64
N5C_A2	66	3,23
N5C_A4	104	4,23
N5C_A6	148	5,07
N5C_A8	191	6,11
N5C_A10	244	7,75
N5C_A11	308	9,24
N5C_A13	392	9,31
N5C_A14	434	12,49

*Tabela 12 - Resultados de concentração para a Farinha Láctea com Frutos.*

Amostra	Concentração obtida (mg/100g)	
	<b>Cálcio</b>	<b>Ferro</b>
N8CMF_A1	41	1,61
N8CMF_A2	51	2,31
N8CMF_A4	79	3,29
N8CMF_A6	106	3,82
N8CMF_A 8	142	5,49
N8CMF_A10	185	6,86
N8CMF_A11	219	8,52
N8CMF_A12	259	9,57
N8CMF_A14	317	11,29
N8CMF_A16	408	15,32
N8CMF_A18	621	19,12

*Tabela 13 - Resultados da concentração para a Farinha não Láctea com Mel.*

Amostra	Concentração obtida (mg/100g)	
	<b>Cálcio</b>	<b>Ferro</b>
N8CM_A1	32	1,13
N8CM_A2	47	1,90
N8CM_A4	85	3,01
N8CM_A6	131	4,10
N8CM_A8	176	5,50
N8CM_A10	237	7,61
N8CM_A12	343	11,04
N8CM_A14	437	14,73
N8CM_A16	643	18,96

*Tabela 14 - Resultados para a Farinha não Láctea com Cacau.*

Amostra	Concentração obtida (mg/100g)	
	<b>Cálcio</b>	<b>Ferro</b>
N8CC_A1	38	3,29
N8CC_A2	91	4,58
N8CC_A3	110	4,85
N8CC_A4	129	5,31
N8CC_A5	149	5,92
N8CC_A6	171	6,62
N8CC_A7	186	7,09
N8CC_A8	201	7,73
N8CC_A9	213	8,06
N8CC_A10	220	8,52
N8CC_A11	224	8,65
N8CC_A12	230	8,75
N8CC_A13	245	9,09
N8CC_A14	277	9,28
N8CC_A15	281	9,48
N8CC_A16	296	9,91
N8CC_A17	315	10,65
N8CC_A18	342	11,51
N8CC_A19	379	12,52
N8CC_A20	445	14,05

## 3.2. MÉTODO ALTERNATIVO – DOSEAMENTO USANDO O EQUIPAMENTO DE XRF

### 3.2.1. OPTIMIZAÇÃO DO APARELHO DE XRF

#### • DEFINIÇÃO DAS MELHORES CONDIÇÕES POR TENTATIVA-ERRO

Antes de se iniciar a calibração do aparelho de XRF foi necessário preparar o aparelho e definir as condições mais propícias para que a diferença entre o valor obtido pelo método alternativo e valor de referência fosse mínima.

Sempre que necessário, alterou-se a condição, a voltagem, a corrente, o filtro, o gás usado na medição e o tempo de medida.

**Condição** – A condição define o intervalo de elementos da tabela periódica que vão ser alvo de análise, e nesse intervalo incluem-se os elementos a ser analisados. Há várias condições que podem ser usadas para analisar estes elementos:

*Tabela 15 - Elementos analisados de acordo com a condição escolhida.*

Condição	Elementos analisados
<Na-Cl>	Na, Mg, P, Cl, Al, Si
<K-V>	Ca, Ti
<Ni-Ag>	Zn
<K-Zn>	K, Ca, Fe, Zn
<Cr-Co>	Mn, Fe
<Cl-V>	Ca, K
<Na-S>	Na, P

Podemos verificar que para o cálcio podemos usar as condições <K-V>, <K-Zn> e <Cl-V> e para o ferro podemos usar as condições <K-Zn> e <Cr-Co>.

**Voltagem e Corrente** – A alteração destes parâmetros teve em conta as limitações do aparelho. A potência do aparelho é igual ao produto entre a corrente ( $\mu\text{A}$ ) e a voltagem (KeV). A corrente pode variar entre 1  $\mu\text{A}$  e 1000  $\mu\text{A}$  e a voltagem aplicada entre 4 KeV e 30 KeV. A potência máxima que se pode aplicar ao aparelho é de 9W. Para aumentar a intensidade dos raios-X, aumenta-se a corrente. O aumento da voltagem faz com que mais elementos fiquem excitados. [15].



**Filtros** – Os filtros localizam-se no caminho óptico entre o tubo de raios-X e a amostra. Serve para diminuir os fótons de raio-X do tubo do feixe primário. Para isso é necessário ajustar a corrente para um valor o suficientemente grande para conseguir um valor de cps razoável mas que não ultrapassem o limite de 60000 cps. O valor ideal é de 50000 cps.

Há cinco tipos diferentes de filtros: Kapton, Al-Thin, Al, Mo, Ag; pode-se também optar por não usar nenhum. Para se verificar qual a melhor opção, fixam-se os outros parâmetros e escolhe-se aquele que dá menores diferenças entre o valor de referência e o valor obtido e valor de cps próximo de 50000.

**Gás usado na medição** – O gás que envolve as amostras durante a medição, pode ser ar ou hélio. Normalmente a análise é feita com ar, mas o hélio pode ser usado para analisar elementos com baixo peso atômico, como o sódio e o magnésio. O uso de hélio melhora a sensibilidade quando se analisam elementos desde o sódio até ao potássio. A precisão quando se analisam estes elementos no ar é pior, por causa da instabilidade devido a variações na pressão do ar. Como neste intervalo não estão os elementos cálcio e ferro, o Hélio nunca foi usado durante a calibração e validação do método.

**Tempo de medida** – O tempo de medida definido pode ser muito abrangente mas interfere com o ruído produzido pelo aparelho. O ruído é inversamente proporcional à raiz quadrada do tempo de medida.

De acordo com a documentação da Nestlé, já existia uma condição para ser aplicada na quantificação de cálcio e ferro (referenciada na tabela 16) para os produtos utilizados.

*Tabela 16 - Condição segundo a instrução laboratorial da Nestlé.*

Elemento	Método de Referência	Condição	Voltagem (kV)	Corrente (mA)	Filtro	Meio	Tempo de Aquisição
Ca	AAS	<K-Zn>	20	450	Al	Hélio	180
Fe	AAS	<K-Zn>	20	450	Al	Hélio	180

Esta condição foi testada, em comparação com outras condições estabelecidas, referenciadas em vários artigos científicos [11,34,38]. Dos resultados obtidos destas comparações iniciais, foram feitos alguns ajustes e chegou-se à conclusão da melhor condição para as amostras que ia analisar (ver tabela 17).

*Tabela 17 - Melhores Condições Obtidas*

Elemento	Método Ref.	Condição	Voltagem	Corrente	Filtro	Meio	Tempo
Cálcio	AAS	<Cl-V>	15	590	Al	Ar	60
Ferro	AAS	<Cr-Co>	20	180	Al	Ar	60

Na otimização do aparelho usou-se sempre o mesmo conjunto de amostras de Farinha Láctea Simples. O valor de referência foi obtido por análise por absorção atômica. Fez-se um conjunto de 3 pastilhas de cada amostra e colocaram-se em caixas de petri.

## • CONDIÇÕES IMPLEMENTADAS

No final da otimização do aparelho, as condições definidas para serem usadas no aparelho XRF para a análise de cálcio e ferro foram as seguintes:

*Tabela 18 - Condições implementadas para doseamento de cálcio e ferro.*

Código do Canal	Composto	Unidade	Casas Decimais	Sequência	Linha	R.O.I. Min	R.O.I. Máx	Nome da Condição	Tempo de Aquisição
Bg					ROI	10,5	11,1	<K-Zn>	120
Ca	Ca	mg/100g	0	1	KA			<K-Zn>	120
Fe	Fe	mg/100g	2	2	KA			<K-Zn>	120

*Legenda: R.O.I – Região de Interesse; Ca – Cálcio; Fe – Ferro; Bg - Background*

A adição de um canal “Bg” serve para eliminar as interferências provocadas pelo ruído do aparelho.

*Tabela 19 - Parâmetros da condição <K-Zn>.*

Nome da Condição	Voltagem (kV)	Corrente (µA)	Filtro	Meio
<K-Zn>	20.00	450	Alumínio	Ar

## 3.2.2. PROTOCOLO PARA DOSEAMENTO DE CÁLCIO E FERRO

### • FORMAÇÃO DE PASTILHAS

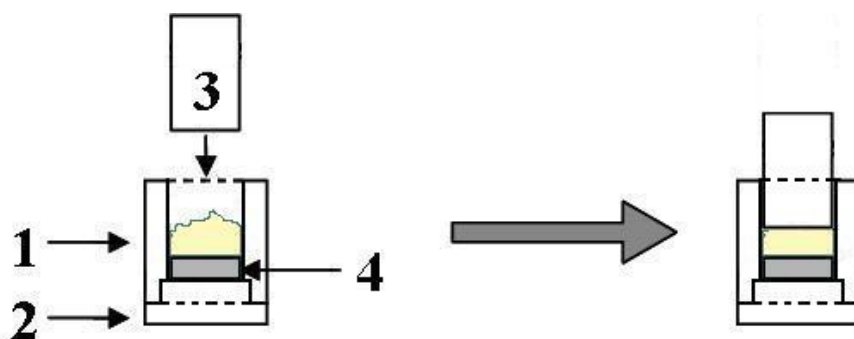
1. Abriu-se a saqueta metálica do produto a analisar;
2. Montou-se o disco metálico (4) por cima da base do cilindro (3), com a parte espelhada voltada para cima. Acoplou-se o cilindro (1) ao conjunto anterior.



1. Cilindro
2. Base do Cilindro
3. Pistão
4. Disco Metálico

3. Pesou-se para dentro da câmara do cilindro 8,00 grama de produto em pó da saqueta.

4. Retirou-se o conjunto da balança e introduziu-se o pistão (3) na câmara do cilindro, com a superfície espelhada em contacto com a amostra. A amostra foi ligeiramente comprimida.



*Fig. 19 - Processo de compressão da amostra no conjunto.*

5. Introduziu-se o conjunto com a amostra na prensa e ajusta-se a pressão. A pressão aplicada varia de acordo com o produto analisado. Para produtos lácteos (Farinha Láctea Normal e com frutas) usou-se uma pressão de 10 toneladas. Para produtos sem leite (Farinhas não lácteas com frutos e com mel) usou-se uma pressão de 13 toneladas. Para Farinhas Não Lácteas Simples e com cacau usaram-se 15 toneladas de pressão.



Fig. 20 - Prensa Hidráulica Automática.

6. Carregou-se no botão de compressão e manteve-se a pressão durante 1 minuto, carregando no botão de compressão sempre que a pressão baixava do valor definido.

7. Passado o tempo de compressão, carregou-se no botão de descompressão e retirar o conjunto.

8. Virou-se o conjunto para que a base do cilindro fique para cima. Retirou-se a base, rodando e puxando suavemente **(a)**.

9. Bateu-se levemente com o pistão numa mesa até se soltar o disco metálico. Retirou-se do conjunto **(b)**. A pastilha foi identificada com um lápis de Grafite.

10. Continuou-se a bater levemente até se soltar a pastilha **(c)**.

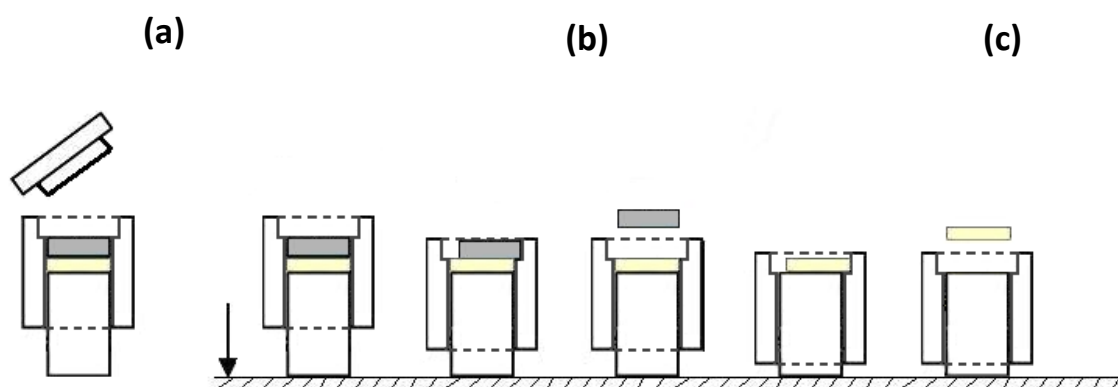


Fig. 21 - Procedimento para retirar a pastilha do conjunto da prensa.

11. Pegou-se a pastilha pelo rebordo, para não deixar marcas de gordura na face a analisar.

12. Fizeram-se as análises de cada amostra em triplicado.

## • COLOCAÇÃO DAS PASTILHAS NO APARELHO XRF

1. Três horas antes do início das leituras, ligou-se o aparelho de XRF.
2. Colocaram-se as pastilhas nos suportes metálicos do aparelho



Fig. 22 - Aparelho de espectroscopia por raio-X Minipal 4.

3. Iniciou-se o programa de análise e criou-se uma nova aplicação para fazer uma curva de calibração para cada grupo de amostras.
4. Configuraram-se as condições, tal como definido anteriormente nas tabelas 18 e 19.

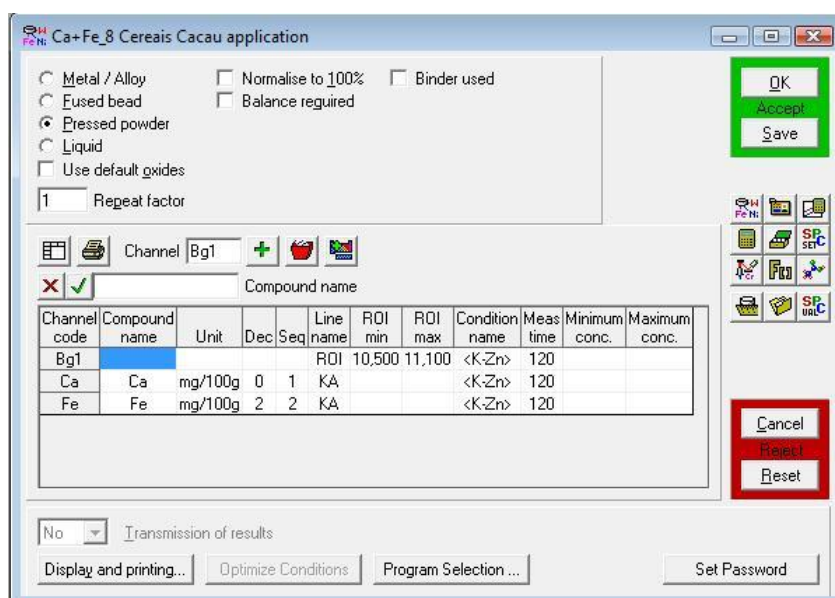


Fig. 23 - Janela do programa Minipal/Minimate, onde se definem as condições da aplicação.

5. Os conjuntos das três pastilhas foram lidos no aparelho. Adicionou-se no programa do aparelho a identificação de cada amostra e o valor de referência determinado por absorção atômica.
6. Salvaram-se os resultados obtidos.

7. Fez-se a deconvolução e traçou-se a curva de calibração.

8. No final foi gerado um relatório pelo programa com os resultados de todas as amostras e as diferenças entre o valor de referência e o valor obtido em cada amostra.

### 3.2.3. RESULTADOS DE CALIBRAÇÃO

#### • AMOSTRAS ESCOLHIDAS PARA CALIBRAÇÃO

Os resultados do relatório foram transpostos para o Excel e foi criada uma tabela com todos os valores. Determinou-se o desvio padrão, o desvio padrão relativo médio e as diferenças entre o valor de referência e o valor obtido pelo método alternativo. Procurou-se que o valor de desvio padrão relativo obtido para cada amostra rondasse os 0,8% para o cálcio e 8,6% para o ferro, referenciado na documentação da Nestlé. No caso de desvios grandes a estes valores voltou-se a repetir a leitura.

O desvio padrão médio obtido para cada grupo de amostras está representado na tabela seguinte:

*Tabela 20 - Média dos Desvios padrões relativos obtido para cada modelo.*

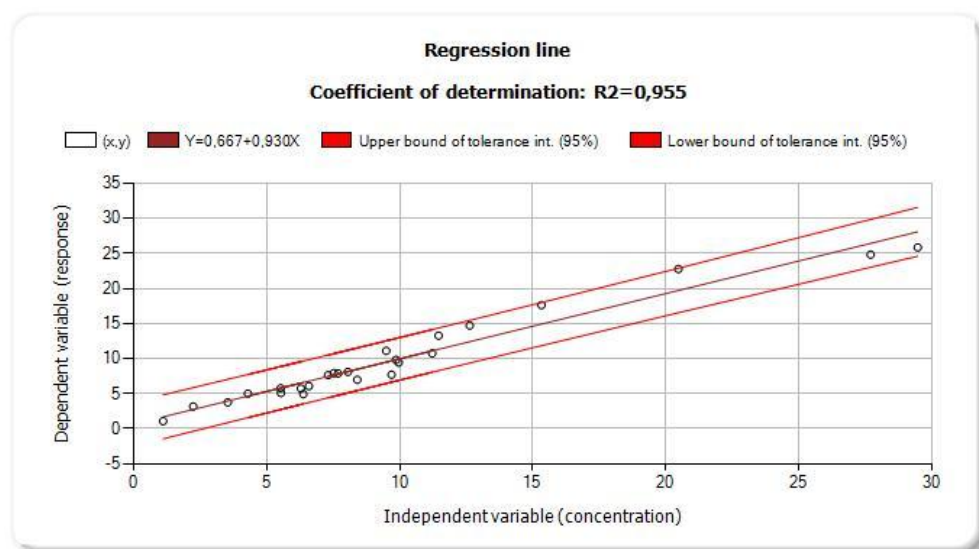
	Média do RSD (r) (%)
Modelo 1, Ferro	6,18
Modelo 1, Cálcio	1,23
Modelo 2, Ferro	3,36
Modelo 2, Cálcio	1,42
Modelo 3, Ferro	2,15
Modelo 3, Cálcio	1,23

As tabelas seguintes mostram o conjunto de 25 amostras que compõem cada curva de calibração e o processamento estatístico realizado.

## • CURVAS DE CALIBRAÇÃO

Tabela 21 - Curva de calibração do Ferro do Modelo 1.

Código Amostra	Nome	Valor de Referência	Resultado 1	Resultado 2	Resultado 3	Média	SD(r)	RSD(r) %	Diferença
103	CS_Base	1,1	1,11	0,86	1,23	1,07	0,19	17,70	0,03
39	CB_9181_01:00	2,23	3,15	3,64	2,76	3,18	0,44	13,85	-0,95
108	CS_A4	3,53	3,96	3,34	3,97	3,76	0,36	9,61	-0,23
147	CS_0107_05:05	6,37	4,54	5,4	4,84	4,93	0,44	8,86	1,44
5	C5F_A6	4,29	5,26	4,85	4,91	5,01	0,22	4,42	-0,72
111	CS_A7	5,53	4,3	5,54	5,42	5,09	0,68	13,45	0,44
81	CM_0342_13:55	6,28	5,99	5,79	5,44	5,74	0,28	4,85	0,54
99	CP_0286_13:53	5,52	5,68	6,03	5,60	5,77	0,23	3,96	-0,25
166	CS_0317	6,58	6,19	5,99	6,04	6,07	0,10	1,71	0,51
143	CS_9314	8,4	7,4	6,87	6,66	6,98	0,38	5,47	1,42
28	C5F_0129	7,3	7,35	7,78	7,76	7,63	0,24	3,18	-0,33
113	CS_A9	9,69	7,6	8,24	7,25	7,70	0,50	6,52	1,99
160	CS_0127_23:18	7,68	8,03	7,85	7,77	7,88	0,13	1,69	-0,20
27	C5F_0110_10:31	7,52	7,7	7,66	8,41	7,92	0,42	5,33	-0,40
167	CS_0340_13:20	8,05	8,18	7,75	8,38	8,10	0,32	3,97	-0,05
57	CBL_0128_23:12	9,96	10,24	9,96	8,08	9,43	1,17	12,46	0,53
40	CB_0108	9,86	9,76	9,92	9,79	9,82	0,09	0,87	0,04
114	CS_A10	11,22	11,91	10,88	9,42	10,74	1,25	11,65	0,48
9	C5F_A11	9,49	10,96	11,55	10,83	11,11	0,38	3,45	-1,62
11	C5F_A13	11,46	13,04	12,98	13,8	13,27	0,46	3,44	-1,81
12	C5F_A14	12,63	15,03	14,88	14,21	14,71	0,44	2,97	-2,08
13	C5F_A16	15,33	17,72	17,44	17,69	17,62	0,15	0,87	-2,29
16	C5F_A19	20,48	21,8	23,64	22,87	22,77	0,92	4,06	-2,29
83	CP_0132_07:31	27,71	25,31	25,32	23,86	24,83	0,84	3,38	2,88
90	CP_0132_09:40	29,48	27,57	25,87	24,08	25,84	1,75	6,75	3,64

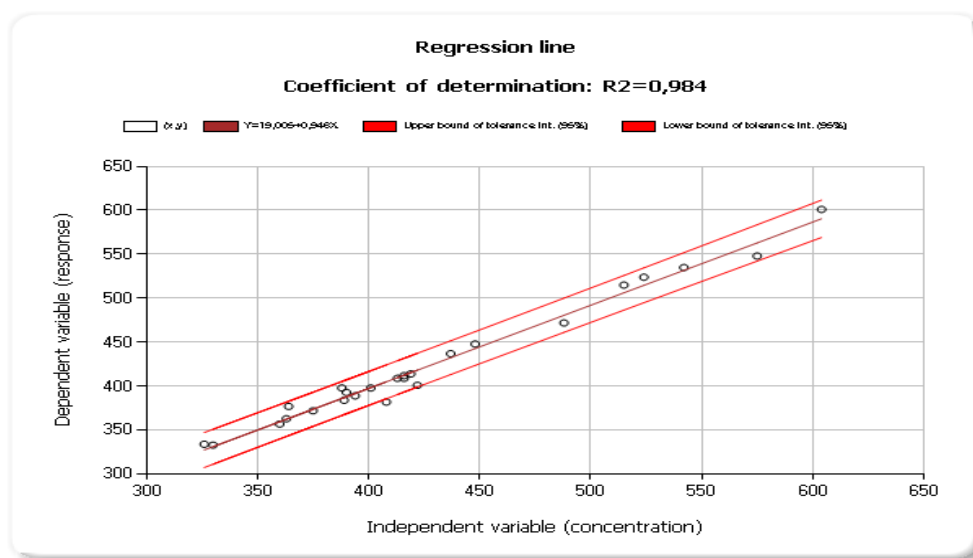


$$R^2 = 0,955$$

Curva de Calibração  
Limites de Tolerância (95%)

Tabela 22 - Curva de calibração do Cálcio, do Modelo 1.

Código Amostra	Nome	Valor de Referência	Resultado 1	Resultado 2	Resultado 3	Média	SD(r)	RSD(r) %	Diferença
2	C5F_A1	326	337	332	334	334	2,52	0,75	-8
95	CP_0153_05:43	401	391	407	395	398	8,33	2,09	3
3	C5F_A2	330	334	330	336	333	3,06	0,92	-3
86	CP_0132_08:45	360	356	353	362	357	4,58	1,28	3
5	C5F_A6	363	369	354	365	363	7,77	2,14	0
108	CS_A4	375	373	368	374	372	3,21	0,86	3
39	CB_9181_01:00	364	375	382	375	377	4,04	1,07	-13
67	CM_0109_21:39	408	379	386	380	382	3,79	0,99	26
94	CP_0153_04:57	389	386	382	384	384	2	0,52	5
111	CS_A7	394	395	384	389	389	5,51	1,41	5
40	CB_0108	390	395	394	391	393	2,08	0,53	-3
28	C5F_0129	388	396	395	403	398	4,36	1,1	-10
138	CS_9259	422	398	402	404	401	3,06	0,76	21
27	C5F_0110_10:31	413	415	411	402	409	6,66	1,63	4
143	CS_9314	416	409	414	414	412	2,89	0,7	4
136	CS_9167_06:48	419	411	415	416	414	2,65	0,64	5
160	CS_0127_23:18	416	413	415	400	409	8,14	1,99	7
114	CS_A10	437	436	437	437	437	0,58	0,13	0
12	C5F_A14	448	449	454	441	448	6,56	1,46	0
116	CS_A12	488	480	462	474	472	9,17	1,94	16
14	C5F_A18	515	506	524	515	515	9	1,75	0
15	C5F_A18.5	524	529	529	513	524	9,24	1,76	0
16	C5F_A19	542	528	543	533	535	7,64	1,43	7
120	CS_A16	575	552	543	550	548	4,73	0,86	27
20	C5F_A21	604	592	615	595	601	12,5	2,08	3



$$R^2 = 0,984$$

Curva de Calibração

Limites de Tolerância (95%)



Tabela 23 - Curva de calibração do Ferro do Modelo 2.

Código Amostra	Nome	Valor de Referência	Resultado 1	Resultado 2	Resultado 3	Média	SD(r)	RSD(r) %	Diferença
226	N8CMF_A1	1,61	1,25	1,22	1,28	1,26	0,03	2,38	0,35
200	N8CM_A1	1,13	2,18	2,13	2,23	2,18	0,05	2,29	-1,05
168	N5C_A1	2,64	2,72	2,8	2,71	2,74	0,05	1,80	-0,10
228	N8CMF_A4	3,29	3,34	3,19	3,1	3,21	0,12	3,78	0,08
202	N8CM_A4	3,01	3,54	3,67	3,68	3,63	0,08	2,15	-0,62
170	N5C_A4	4,23	4,37	3,92	3,82	4,04	0,29	7,26	0,19
229	N8CMF_A6	3,82	4,21	4,39	3,97	4,19	0,21	5,03	-0,37
203	N8CM_A6	4,10	4,68	4,92	4,64	4,75	0,15	3,19	-0,65
188	N5C_9090_23:32	4,66	5,28	5,04	5,05	5,12	0,14	2,65	-0,46
221	N8CM_0144_02:25	4,84	5,01	5,05	5,04	5,03	0,02	0,41	-0,19
220	N8CM_0143_15:58	5,07	5,25	5,2	5,06	5,17	0,10	1,91	-0,10
249	N8CMF_0173_23:10	5,34	5,19	5,55	4,96	5,23	0,30	5,68	0,11
244	N8CMF_0033_04:55	5,28	5,54	5,41	5,24	5,40	0,15	2,79	-0,12
196	N5C_9334_23:27	5,42	5,43	5,38	5,46	5,42	0,04	0,75	0,00
213	N8CM_0116_05:21	5,28	5,65	5,3	5,42	5,46	0,18	3,26	-0,18
251	N8CMF_0174_10:40	5,37	5,4	5,65	5,5	5,52	0,13	2,28	-0,15
214	N8CM_0117_04:19	5,78	5,4	5,6	5,87	5,62	0,24	4,19	0,16
179	N5C_8015_01:52	5,93	5,61	5,33	6,06	5,67	0,37	6,50	0,26
184	N5C_9046_04:22	6,27	5,58	6,09	5,94	5,87	0,26	4,47	0,40
183	N5C_9045_22:31	6,12	5,83	6,1	6,32	6,08	0,25	4,03	0,04
231	N8CMF_A10	6,86	6,16	5,97	6,44	6,19	0,24	3,82	0,67
198	N5C_0114_BB11	7,33	7,44	7,21	7,1	7,25	0,17	2,39	0,08
233	N8CMF_A12	9,57	8,37	8,5	9,59	8,82	0,67	7,60	0,75
206	N8CM_A12	11,04	9,87	10,19	9,96	10,01	0,17	1,65	1,03
176	N5C_A14	12,49	12,01	11,7	12,13	11,95	0,22	1,86	0,54

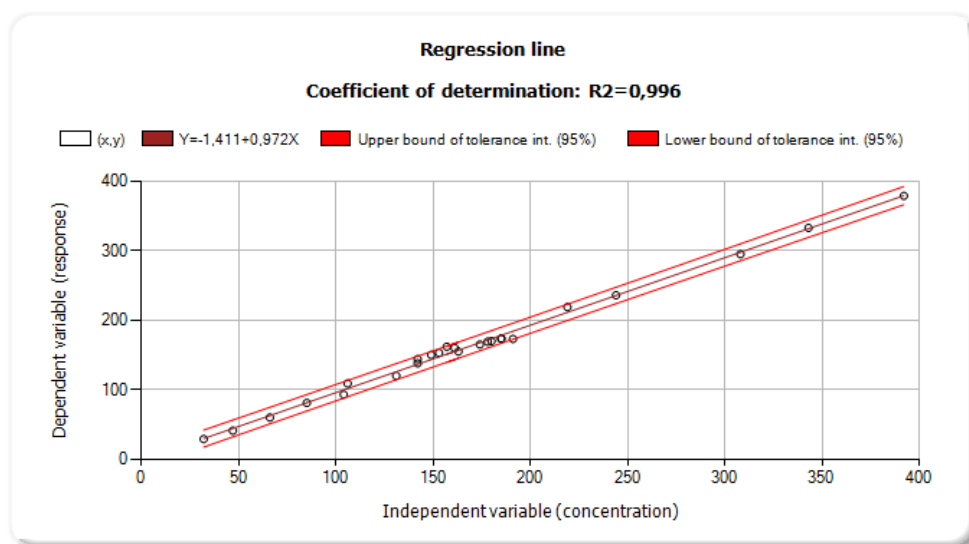


$$R^2 = 0,980$$

Curva de Calibração  
Limites de Tolerância (95%)

Tabela 24 - Curva de calibração do Cálcio do Modelo 2

Código Amostra	Nome	Valor de Referência	Resultado 1	Resultado 2	Resultado 3	Média	SD(r)	RSD(r) %	Diferença
200	N8CM_A1	32	30	28	28	29	1,15	4,03	3
168	N5C_A1	47	42	42	40	41	1,15	2,79	6
169	N5C_A2	66	60	60	60	60	0,00	0,00	6
202	N8CM_A4	85	82	81	80	81	1,00	1,23	4
170	N5C_A4	104	93	93	93	93	0,00	0,00	11
229	N8CMF_A6	106	115	106	106	109	5,20	4,77	-3
203	N8CM_A6	131	121	121	119	120	1,15	0,96	11
230	N8CMF_A8	142	141	136	137	138	2,65	1,92	4
245	N8CMF_0101_15:19	142	146	143	144	144	1,53	1,06	-2
237	N8CMF_9068_08:00	149	150	152	149	150	1,53	1,02	-1
245	N8CMF_0201_12:46	153	151	156	153	153	2,52	1,64	0
252	N8CM_0119_23:06	163	157	157	152	155	2,89	1,86	8
213	N8CM_0116_05:21	161	159	161	159	160	1,15	0,72	1
241	N8CMF_9305_15:58	157	163	163	159	162	2,31	1,43	-5
215	N8CM_0118_02:52	174	165	165	166	165	0,58	0,35	9
182	N5C_9037_12:41	178	170	169	167	169	1,53	0,91	9
186	N5C_9047_07:25	180	163	177	171	170	7,02	4,12	10
231	N8CMF_A10	185	172	173	175	173	1,53	0,88	12
179	N5C_8015_01:52	185	173	174	174	174	0,58	0,33	11
191	N5C_9142_07:08	191	171	177	172	173	3,21	1,85	18
232	N8CMF_A11	219	219	221	218	219	1,53	0,70	0
173	N5C_A10	244	236	238	234	236	2,00	0,85	8
174	N5C_A11	308	295	295	295	295	0,00	0,00	13
206	N8CM_A12	343	336	333	330	333	3,00	0,90	10
175	N5C_A13	392	379	383	374	379	4,51	1,19	13

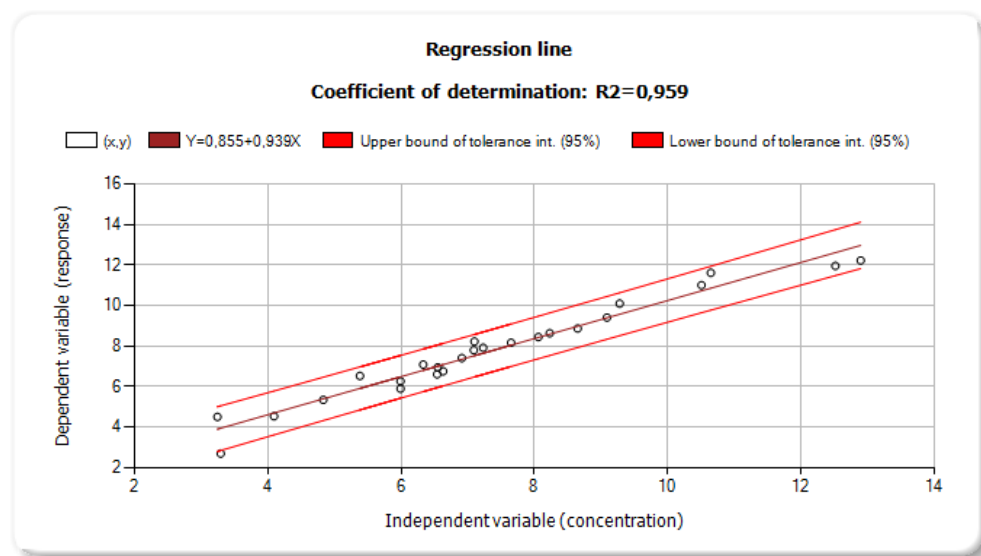


$$R^2 = 0,996$$

■ Curva de Calibração  
■ Limites de Tolerância (95%)

Tabela 25 - Curva de calibração do Ferro do Modelo 3.

Código Amostra	Nome	Valor de Referência	Resultado 1	Resultado 2	Resultado 3	Média	SD(r)	RSD(r) %	Diferença
265	N8CC_21-03_A1	3,29	2,75	2,62	2,7	2,69	0,07	2,44	0,60
339	N8CC_0324_08:48	3,24	4,52	4,51	4,46	4,50	0,03	0,71	-1,26
334	N8CC_0324 07:14	4,09	4,51	4,5	4,57	4,53	0,04	0,84	-0,44
298	N8CC_9330 06:35	4,83	5,34	5,38	5,29	5,34	0,05	0,84	-0,51
306	N8CC_0090_06:52	5,99	5,81	5,99	5,86	5,89	0,09	1,58	0,10
290	N8CC_9138_23:04	5,99	6,13	6,32	6,32	6,26	0,11	1,75	-0,27
287	N8CC_9087_16:10	5,38	6,65	6,49	6,41	6,52	0,12	1,88	-1,14
295	N8CC_9326 04:12	6,54	6,64	6,44	6,71	6,60	0,14	2,12	-0,06
291	N8CC_9188_05:54	6,63	6,79	6,75	6,71	6,75	0,04	0,59	-0,12
292	N8CC_9189_13:12	6,55	6,83	7,03	6,95	6,94	0,10	1,45	-0,39
293	N8CC_9189_13:21	6,33	7,19	7,02	7,03	7,08	0,10	1,35	-0,75
369	N8CC_1062_13:03	6,91	7,47	7,34	7,38	7,40	0,07	0,90	-0,49
271	N8CC_21-03_A7	7,09	7,91	7,71	7,76	7,79	0,10	1,34	-0,70
341	N8CC_0345 21:37	7,23	8,01	7,85	7,88	7,91	0,09	1,07	-0,68
365	N8CC_1062_07:40	7,65	8,13	8,25	8,11	8,16	0,08	0,93	-0,51
332	N8CC_0324_04:56	7,10	8,04	8,34	8,29	8,22	0,16	1,95	-1,12
273	N8CC_21-03_A9	8,06	8,4	8,33	8,6	8,44	0,14	1,66	-0,38
347	N8CC_0346 20:36	8,23	8,6	8,45	8,83	8,63	0,19	2,22	-0,40
275	N8CC_21-03_A11	8,65	8,89	9,22	8,46	8,86	0,38	4,30	-0,21
276	N8CC_21-03_A12	9,09	9,17	9,6	9,42	9,40	0,22	2,30	-0,31
279	N8CC_21-03_A15	9,28	9,73	10,2	10,33	10,09	0,32	3,13	-0,81
308	N8CC_0133_08:32	10,51	11,43	11,34	10,23	11,00	0,67	6,08	-0,49
281	N8CC_21-03_A17	10,65	11,32	11,32	12,18	11,61	0,50	4,28	-0,96
283	N8CC_21-03_A19	12,52	11,87	12,45	11,54	11,95	0,46	3,85	0,57
262	N8CC_A12	12,90	12,53	11,64	12,5	12,22	0,51	4,13	0,68

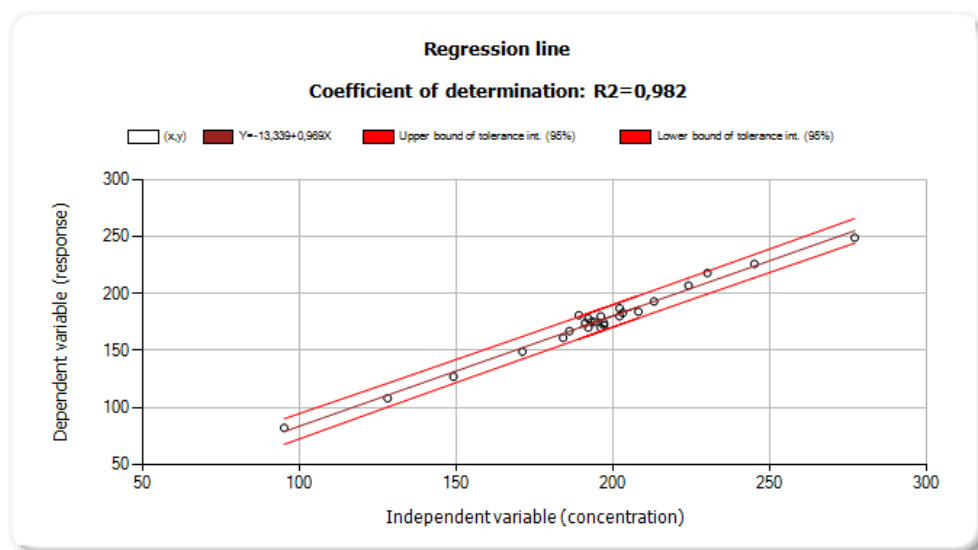


$R^2 = 0,959$

Curva de Calibração  
 Limites de Tolerância (95%)

Tabela 26 - Curva de calibração do Cálcio do Modelo 3.

Código Amostra	Nome	Valor de Referência	Resultado 1	Resultado 2	Resultado 3	Média	SD(r)	RSD(r) %	Diferença
257	N8CC_A4	95	80	86	79	82	3,79	4,64	13
268	N8CC_21-03_A4	128	107	108	108	108	0,58	0,54	20
269	N8CC_21-03_A5	149	129	124	128	127	2,65	2,08	22
270	N8CC_21-03_A6	171	150	150	147	149	1,73	1,16	22
320	N8CC_0137_09:05	184	159	163	160	161	2,08	1,30	23
271	N8CC_21-03_A7	186	164	169	167	167	2,52	1,51	19
290	N8CC_9138_23:04	192	170	174	165	170	4,51	2,66	22
304	N8CC_0030_02:59	196	168	173	170	170	2,52	1,48	26
360	N8CC_1062_01:24	197	171	173	171	172	1,15	0,67	25
359	N8CC_1062_00:40	197	172	173	176	174	2,08	1,20	23
319	N8CC_0137_04:57	191	173	177	172	174	2,65	1,52	17
352	N8CC_1061_05:26	193	176	175	173	175	1,53	0,87	18
368	N8CC_1062_11:20	194	177	175	174	175	1,53	0,87	19
346	N8CC_0346_13:49	192	178	177	179	178	1,00	0,56	14
331	N8CC_0324_04:12	196	180	179	180	180	0,58	0,32	16
300	N8CC_9331_07:36	202	179	180	180	180	0,58	0,32	22
345	N8CC_0346_08:59	189	179	184	179	181	2,89	1,60	8
348	N8CC_0346_22:56	203	184	183	182	183	1,00	0,55	20
349	N88C_1059_BB26	208	185	183	184	184	1,00	0,54	24
335	N8CC_0324_07:45	202	185	188	188	187	1,73	0,93	15
273	N8CC_21-03_A9	213	198	190	192	193	4,16	2,15	20
275	N8CC_21-03_A11	224	210	207	205	207	2,52	1,21	17
276	N8CC_21-03_A12	230	217	218	218	218	0,58	0,27	12
277	N8CC_21-03_A13	245	229	225	225	226	2,31	1,02	19
278	N8CC_21-03_A14	277	251	248	247	249	2,08	0,84	28



R<sup>2</sup> = 0,982

Curva de Calibração  
 Limites de Tolerância (95%)

## PROCESSAMENTO ESTATÍSTICO NO PROGRAMA Q-STAT

### • VERIFICAÇÃO DA LINEARIDADE DA CALIBRAÇÃO

*Tabela 27 - Resultados de Linearidade do programa Q-Stat, para o Modelo 1.*

	Unidade	Número de Amostras	Gama de Concentração		Declive		Intercepção		R <sup>2</sup>	SEC
			Min	Máx	Valor Central	Intervalo Conf. 95% Inclui o zero?	Valor Central	Intervalo Conf. 95% Inclui o zero?		
Cálcio	mg/100g	25	326	604	0,946	N	19,005	S	0,984	9,09
Ferro	mg/100g	25	1,10	29,48	0,930	N	0,667	S	0,955	1,44

*Tabela 28 - Resultados de Linearidade do Programa Q-Stat, para o Modelo 2.*

	Unidade	Número de Amostras	Gama de Concentração		Declive		Intercepção		R <sup>2</sup>	SEC
			Min	Máx	Valor Central	Intervalo Conf. 95% Inclui o zero?	Valor Central	Intervalo Conf. 95% Inclui o zero?		
Cálcio	mg/100g	25	32	392	0,972	N	-1,411	S	0,996	5,51
Ferro	mg/100g	25	1,13	12,50	0,872	N	0,669	N	0,980	0,33

*Tabela 29 - Resultados de Linearidade do Programa Q-Stat, para o Modelo 3.*

	Unidade	Número de Amostras	Gama de Concentração		Declive		Intercepção		R <sup>2</sup>	SEC
			Min	Máx	Valor Central	Intervalo Conf. 95% Inclui o zero?	Valor Central	Intervalo Conf. 95% Inclui o zero?		
Cálcio	mg/100g	25	95	277	0,969	S	-13,339	N	0,982	4,64
Ferro	mg/100g	25	3,26	12,90	0,939	S	0,855	N	0,959	0,49

### 3.2.4. RESULTADOS DE VALIDAÇÃO

- **AMOSTRAS ESCOLHIDAS PARA VALIDAÇÃO**

Escolheu-se um segundo lote de 25 amostras para a formação da curva de validação. Estas amostras têm que estar incluídas no intervalo de calibração e têm que ocupar pelo menos 95% do intervalo de calibração.

O critério de selecção foi o mesmo do que foi utilizado para a selecção das amostras de calibração. Seleccionaram-se as amostras com menores diferenças entre o valor de referência e o valor dado pelo programa do XRF e aquelas que apresentavam um desvio padrão relativo mais próximo de 0,8% para o cálcio e de 8,6% para o ferro.

A média dos desvios padrões relativos de cada conjunto de amostras está representada na tabela seguinte:

*Tabela 30 - Média do Desvio padrão Relativo (%) das curvas de validação*

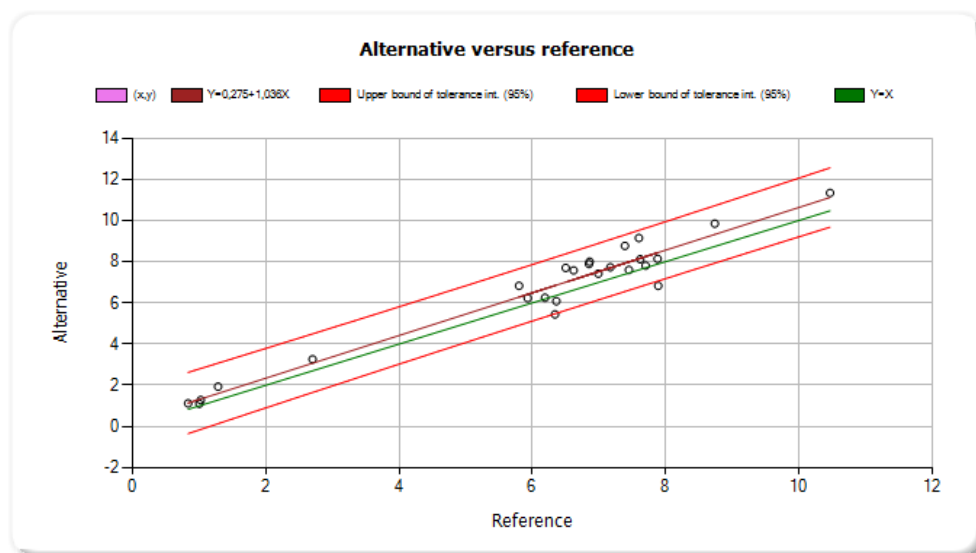
	RSD (r) Médio (%)
<i>Modelo 1, Ferro</i>	<i>5,31</i>
<i>Modelo 1, Cálcio</i>	<i>1,36</i>
<i>Modelo 2, Ferro</i>	<i>4,94</i>
<i>Modelo 2, Cálcio</i>	<i>2,35</i>
<i>Modelo 3, Ferro</i>	<i>3,65</i>
<i>Modelo 3, Cálcio</i>	<i>1,65</i>

As tabelas seguintes mostram o conjunto das 25 amostras usadas em cada curva de validação e o processamento estatístico realizado em folhas de Excel.

## • CURVAS DE VALIDAÇÃO

Tabela 31 - Curva de validação do ferro, do Modelo 1

Código Amostra	Nome	Valor de Referência	Resultado 1	Resultado 2	Resultado 3	Média	SD(r)	RSD(r) %	Diferença
105	CS_A1	1,00	1,01	1,13	1,15	1,10	0,08	6,90	-0,10
1	C5F_Base	0,83	1,19	1,14	1,02	1,12	0,09	7,82	-0,29
2	C5F_A1	1,02	1,24	1,29	1,32	1,28	0,04	3,15	-0,26
3	C5F_A2	1,28	2,07	1,91	1,81	1,93	0,13	6,80	-0,65
4	C5F_A4	2,70	3,45	3,07	3,25	3,26	0,19	5,84	-0,56
139	CS_9287	6,34	5,28	5,27	5,78	5,44	0,29	5,36	0,90
100	CP_0286_16:25	6,36	5,81	5,95	6,48	6,08	0,35	5,81	0,28
98	CP_0286_09:40	5,93	6,24	5,74	6,70	6,23	0,48	7,71	-0,30
80	CM_0286_22:31	6,19	5,73	6,34	6,69	6,25	0,49	7,77	-0,06
6	C5F_A8	5,80	6,65	7,44	6,39	6,83	0,55	8,01	-1,03
94	CP_0153_04:57	7,89	6,84	7,33	6,32	6,83	0,51	7,39	1,06
102	CP_0342 18:14	6,99	7,19	8,07	6,99	7,42	0,57	7,75	-0,43
7	C5F_A9	6,62	7,67	7,26	7,80	7,58	0,28	3,72	-0,96
38	C5F_0344_06:18	7,45	7,19	7,47	8,14	7,60	0,49	6,42	-0,15
43	CB_0285	6,50	7,40	7,61	8,10	7,70	0,36	4,66	-1,20
97	CP_0242_05:37	7,17	7,65	8,13	7,41	7,73	0,37	4,74	-0,56
65	CBL_0261_10:24	7,70	7,57	8,17	7,69	7,81	0,32	4,07	-0,11
33	C5F_0132_03:05	6,85	8,37	7,92	7,37	7,89	0,50	6,35	-1,04
36	C5F_0155_16:46	6,86	7,83	8,30	7,88	8,00	0,26	3,23	-1,14
54	CBL_0002_19:36	7,62	8,51	7,81	8,05	8,12	0,36	4,38	-0,50
41	CB_0156	7,88	8,93	7,53	7,95	8,14	0,72	8,83	-0,26
8	C5F_A10	7,39	8,86	8,82	8,63	8,77	0,12	1,40	-1,38
44	CB_0342	7,60	9,04	9,24	9,18	9,15	0,10	1,12	-1,55
45	CB_0343	8,74	9,81	9,99	9,75	9,85	0,12	1,27	-1,11
10	C5F_A12	10,47	11,43	11,53	11,07	11,34	0,24	2,13	-0,87

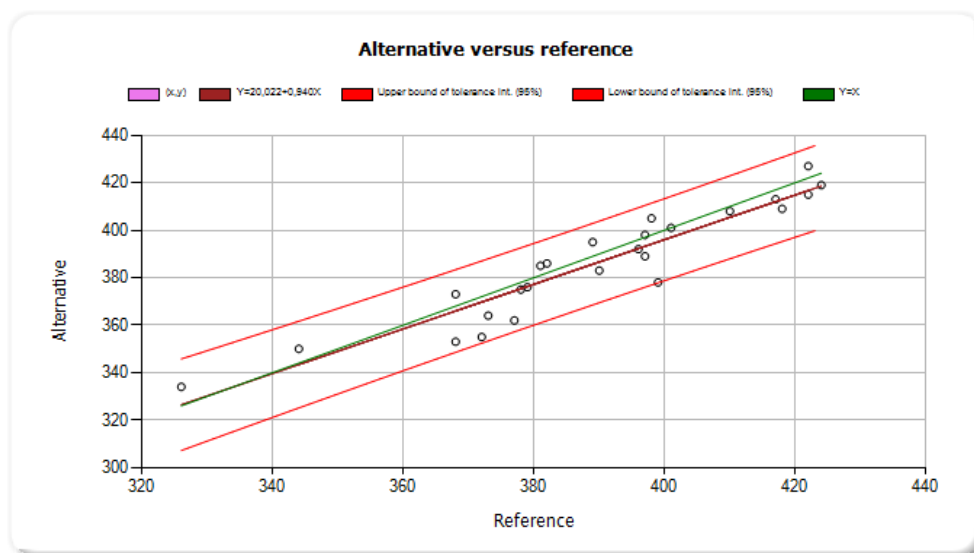


$$R^2 = 0,894$$

Curva de Validação  
Limites de Tolerância (95%)  
 $Y=X$

Tabela 32 - Curva de validação do cálcio, do Modelo 1

Código Amostra	Nome	Valor de Referência	Resultado 1	Resultado 2	Resultado 3	Média	SD(r)	RSD(r) %	Diferença
36	C5F_0155_16:46	401	401	401	402	401	0,58	0,14	0
112	CS_A8	397	396	399	398	398	1,53	0,38	-1
99	CP_0286_13:53	372	353	356	357	355	2,08	0,59	17
11	C5F_A13	447	433	447	440	440	7,00	1,59	7
54	CBL_0002_19:36	397	389	392	385	389	3,51	0,9	8
43	CB_0285_BB15	368	356	349	355	353	3,79	1,07	15
45	CB_0343_BB6	424	414	421	421	419	4,04	0,97	5
63	CBL_0132_13:23	410	406	405	413	408	4,36	1,07	2
147	CS_0107_05:05	418	411	412	404	409	4,36	1,07	9
10	C5F_A12	422	422	427	431	427	4,51	1,06	-5
38	C5F_0344_06:18	399	377	374	383	378	4,58	1,21	21
144	CS_9315	417	410	410	418	413	4,62	1,12	4
4	C5F_A4	344	348	346	355	350	4,73	1,35	-6
37	C5F_0287_10:55	381	387	380	389	385	4,73	1,23	-4
102	CP_0342_18:14	377	368	359	360	362	4,93	1,36	15
24	C5F_9181_10:00	398	407	409	399	405	5,29	1,31	-7
113	CS_A9	422	417	408	419	415	5,86	1,41	7
8	C5F_A10	389	402	393	390	395	6,24	1,58	-6
72	CM_0132_15:49	368	366	375	379	373	6,66	1,78	-5
6	C5F_A8	379	372	384	372	376	6,93	1,84	3
44	CB_0342_BB5	378	367	381	377	375	7,21	1,92	3
107	CS_A3	373	372	360	359	364	7,23	1,99	9
7	C5F_A9	382	395	380	384	386	7,77	2,01	-4
110	CS_A6	390	377	392	380	383	7,94	2,07	7
33	C5F_0132_03:05	396	395	402	380	392	11,24	2,86	4



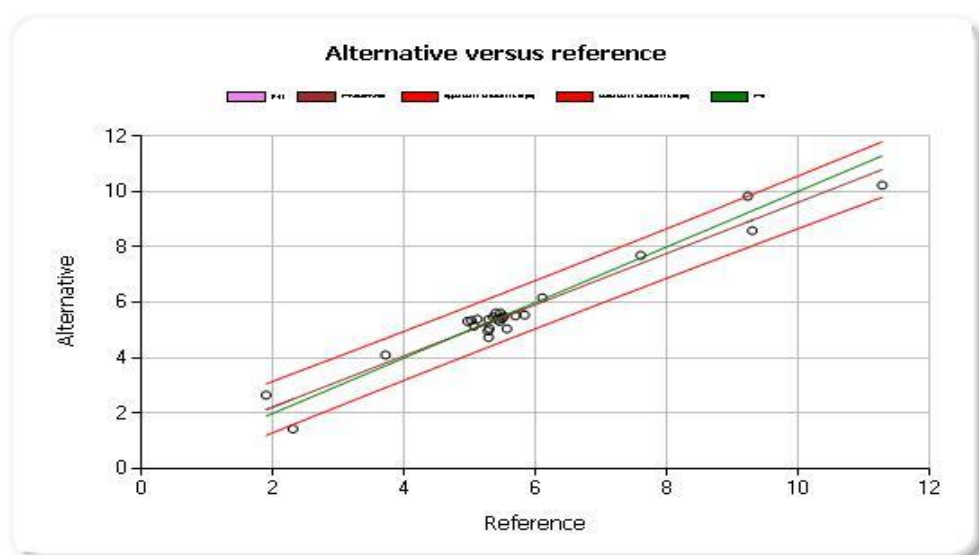
$$R^2 = 0,889$$

Curva de Validação  
Limites de Tolerância (95%)  
 $Y=X$



Tabela 33 - Curva de validação do ferro, do Modelo 2

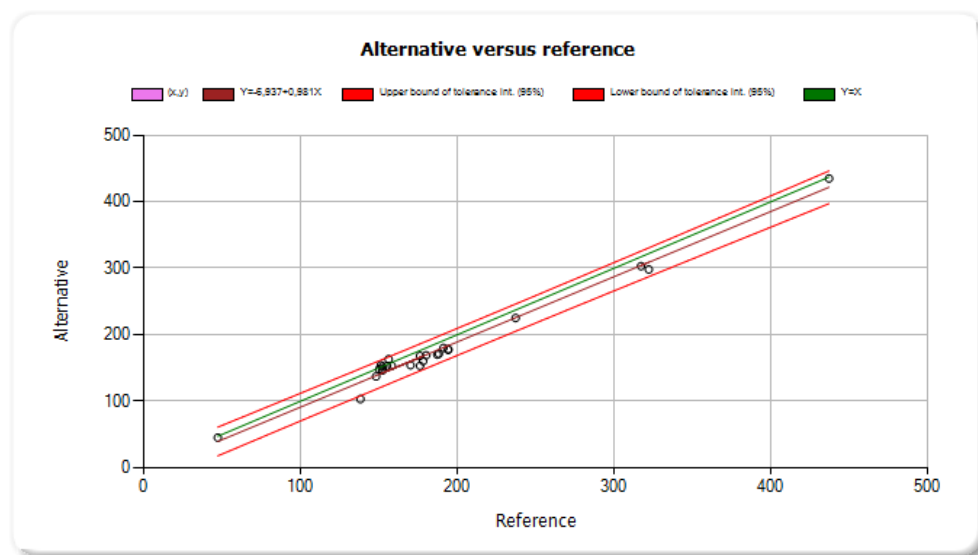
Código Amostra	Nome	Valor de Referência	Resultado 1	Resultado 2	Resultado 3	Média	SD(r)	RSD(r) %	Diferença
201	N8CM_A2	1,90	2,91	2,61	2,45	2,66	0,23	8,79	-0,76
204	N8CM_A8	5,50	4,94	5,39	5,97	5,43	0,52	9,50	0,07
205	N8CM_A10	7,61	8,21	7,00	7,89	7,70	0,63	8,14	-0,09
240	N8CMF_9211_15:35	5,03	5,61	5,16	5,28	5,35	0,23	4,36	-0,32
171	N5C_A6	5,07	5,28	5,3	4,88	5,15	0,24	4,60	-0,08
172	N5C_A8	6,11	6,10	6,52	5,89	6,17	0,32	5,20	-0,06
227	N8CMF_A2	2,31	1,41	1,45	1,46	1,44	0,03	1,84	0,87
234	N8CMF_A14	11,29	10,55	10,05	10,09	10,23	0,28	2,72	1,06
207	N8CM_A14	14,73	12,05	13,73	12,78	12,85	0,84	6,55	1,88
250	N8CMF_0174_01:18	5,57	5,08	5,11	4,97	5,05	0,07	1,46	0,52
243	N8CMF_0032_06:07	5,30	4,82	5,04	5,32	5,06	0,25	4,95	0,24
248	N8CMF_0145_02:05	5,28	4,58	5,04	5,29	4,97	0,36	7,25	0,31
238	N8CMF_9101_05:54	5,70	5,78	5,32	5,47	5,52	0,23	4,25	0,18
239	N8CMF_9127_04:41	5,43	5,27	5,56	5,33	5,39	0,15	2,84	0,04
236	N8CMF_0120_21:48	5,52	5,89	5,27	5,36	5,51	0,34	6,08	0,01
194	N5C_9195_22:16	5,47	5,55	5,25	6,06	5,62	0,41	7,29	-0,15
195	N5C_9298_13:42	4,97	5,16	5,32	5,49	5,32	0,17	3,10	-0,35
189	N5C_9124_03:47	5,29	5,09	5,49	5,57	5,38	0,26	4,78	-0,09
181	N5C_9015_02:37	5,29	4,78	4,76	4,67	4,74	0,06	1,24	0,55
197	N5C_9335_07:05	5,46	5,50	5,34	5,13	5,32	0,19	3,49	0,14
212	N8CM_0101_10:14	3,72	4,18	4,15	4,00	4,11	0,10	2,35	-0,39
222	N8CM_0193_20:15	5,40	5,43	5,92	5,52	5,62	0,26	4,64	-0,22
218	N8CM_0141_13:40	5,36	5,88	5,07	5,45	5,47	0,41	7,41	-0,11
219	N8CM_0142_07:17	5,12	5,39	5,38	5,43	5,40	0,03	0,49	-0,28
209	N8CM_9050_03:10	5,84	4,93	6,02	5,69	5,55	0,56	10,08	0,29



$$R^2 = 0,951$$

Tabela 34 - Curva de validação do cálcio, do Modelo 2

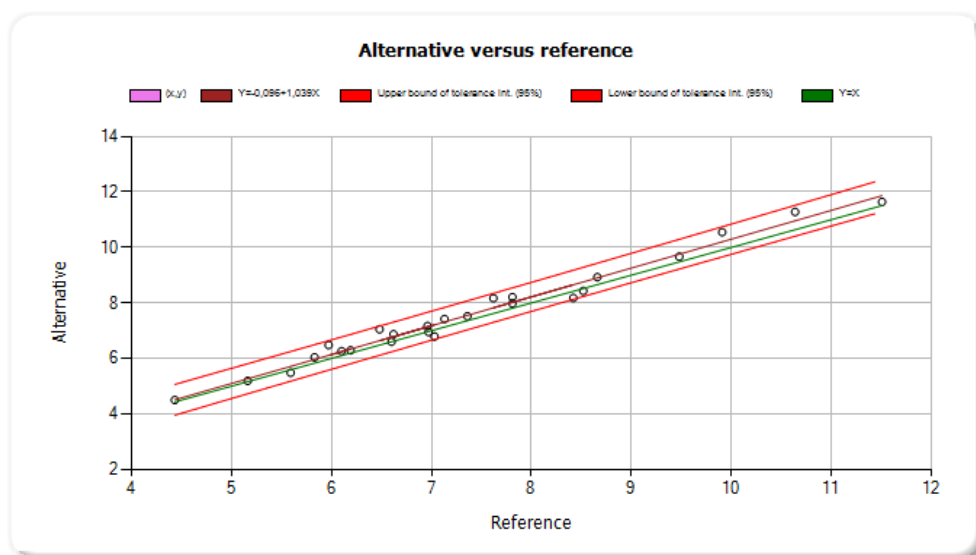
Código Amostra	Nome	Valor de Referência	Resultado 1	Resultado 2	Resultado 3	Média	SD(r)	RSD(r) %	Diferença
201	N8CM_A2	47	45	47	43	45	2,00	4,44	2
212	N8CM_0101_10:14	138	104	104	102	103	1,15	1,12	35
171	N5C_A6	148	137	136	139	137	1,53	1,11	11
248	N8CMF_0145_02:05	150	141	158	145	148	8,89	6,01	2
251	N8CMF_0174_10:40	145	146	147	146	146	0,58	0,39	-1
250	N8CMF_0174_01:18	152	144	147	154	148	5,13	3,46	4
238	N8CMF_9101_05:54	152	149	149	157	152	4,62	3,05	0
240	N8CMF_9211_15:35	158	149	156	153	153	3,51	2,30	5
239	N8CMF_9127_04:41	155	150	158	151	153	4,36	2,85	2
222	N8CM_0193_20:15	176	154	156	150	153	3,06	1,99	23
218	N8CM_0141_13:40	170	151	154	156	154	2,52	1,64	16
243	N8CMF_0032_06:07	151	150	161	152	154	5,86	3,80	-3
219	N8CM_0142_07:17	178	162	161	156	160	3,21	2,01	18
246	N8CMF_0120_21:48	156	166	162	162	163	2,31	1,41	-7
204	N8CM_A8	176	167	163	175	168	6,11	3,63	8
197	N5C_9335_07:05	180	167	168	172	169	2,65	1,57	11
195	N5C_9298_13:42	187	168	167	174	170	3,79	2,23	17
181	N5C_9015_02:37	188	174	176	164	171	6,43	3,75	17
189	N5C_9124_03:47	194	180	176	176	177	2,31	1,30	17
194	N5C_9195_22:16	194	173	184	176	178	5,69	3,20	16
172	N5C_A8	191	175	185	181	180	5,03	2,79	11
205	N8CM_A10	237	225	223	226	225	1,53	0,68	12
209	N8CM_9050_03:10	322	300	300	295	298	2,89	0,97	24
234	N8CMF_A14	317	303	299	306	303	3,51	1,16	14
207	N8CM_A14	437	433	445	428	435	8,74	2,01	2



$$R^2 = 0,984$$

Tabela 35 - Curva de validação do ferro, do Modelo 3

Código Amostra	Nome	Valor de Referência	Resultado 1	Resultado 2	Resultado 3	Média	SD(r)	RSD(r) %	Diferença
257	N8CC_A4	4,43	4,57	4,55	4,39	4,50	0,10	2,19	-0,07
320	N8CC_0137_09:05	5,16	5,18	5,01	5,39	5,19	0,19	3,67	-0,03
258	N8CC_A6	5,59	5,3	5,30	5,83	5,48	0,31	5,59	0,11
328	N8CC_0291 13:40	5,83	6,33	5,95	5,85	6,04	0,25	4,19	-0,21
290	N8CC_9138 23:04	6,1	6,13	6,32	6,32	6,26	0,11	1,75	-0,16
323	N8CC_0245 22:12	6,19	6,4	5,92	6,56	6,29	0,33	5,29	-0,10
327	N8CC_0290 12:12	5,97	6,27	6,63	6,53	6,48	0,19	2,87	-0,51
307	N8CC_0091	6,6	6,76	6,78	6,25	6,60	0,30	4,55	0,00
314	N8CC_0134_16:33	7,03	6,57	7,00	6,81	6,79	0,22	3,17	0,24
316	N8CC_0135_13:32	6,62	7,05	6,65	6,91	6,87	0,20	2,95	-0,25
285	N8CC_9054_14:22	6,97	6,9	7,11	6,84	6,95	0,14	2,04	0,02
300	N8CC_9331_07:36	6,48	6,89	7,13	7,12	7,05	0,14	1,93	-0,57
319	N8CC_0137 04:57	6,96	7,21	7,35	6,94	7,17	0,21	2,91	-0,21
370	N8CC_1062_13:17	7,13	7,33	7,27	7,67	7,42	0,22	2,91	-0,29
368	N8CC_1062_11:20	7,36	7,68	7,21	7,68	7,52	0,27	3,61	-0,16
351	N8CC_1061_02:07	7,81	8,04	7,78	8,12	7,98	0,18	2,23	-0,17
343	N8CC_0346 00:47	7,62	7,98	8,22	8,31	8,17	0,17	2,09	-0,55
354	N8CC_1061_07:27	8,42	8,07	8,37	8,11	8,18	0,16	1,99	0,24
363	N8CC_1062_05:15	7,81	8,39	8,19	8,05	8,21	0,17	2,08	-0,40
274	N8CC_21-03_A10	8,52	8,84	7,97	8,49	8,43	0,44	5,19	0,09
260	N8CC_A10	8,66	9,43	8,64	8,71	8,93	0,44	4,90	-0,27
278	N8CC_21-03_A14	9,48	9,64	9,15	10,23	9,67	0,54	5,59	-0,19
280	N8CC_21-03_A16	9,91	11,3	10,17	10,17	10,55	0,65	6,19	-0,64
261	N8CC_A11	10,64	10,73	11,11	12,01	11,28	0,66	5,83	-0,64
282	N8CC_21-03_A18	11,51	12,35	11,07	11,51	11,64	0,65	5,59	-0,13

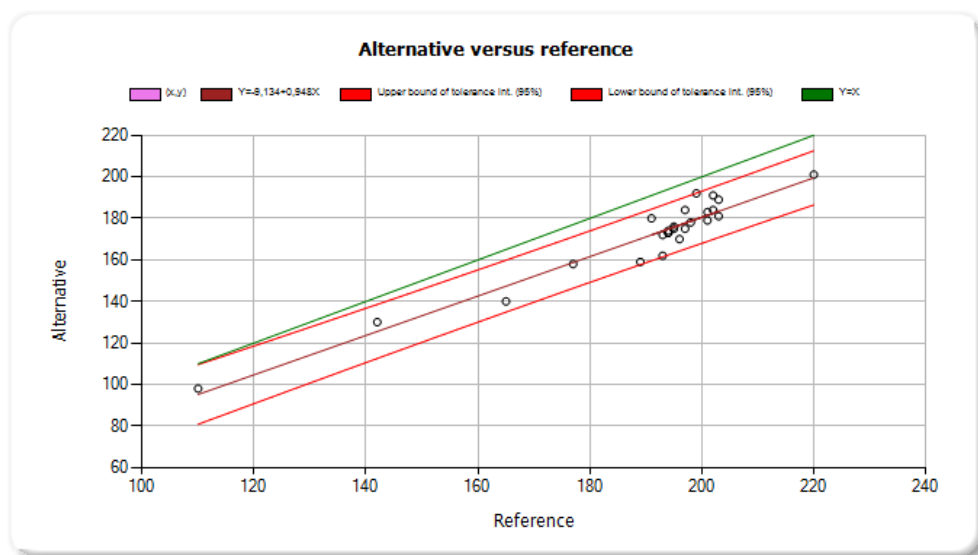


$$R^2 = 0,982$$

Curva de Validação  
Limites de Tolerância (95%)  
Y=X

Tabela 36 - Curva de validação do cálcio, do Modelo 3

Código Amostra	Nome	Valor de Referência	Resultado 1	Resultado 2	Resultado 3	Média	SD(r)	RSD(r) %	Diferença
267	N8CC_21-03_A3	110	101	92	100	98	4,93	5,05	12
258	N8CC_A6	142	125	131	133	130	4,16	3,21	12
314	N8CC_0134_16:33	195	168	174	168	170	3,46	2,04	25
315	N8CC_0134_20:39	193	168	173	173	171	2,89	1,68	22
355	N8CC_1061_09:19	193	173	169	173	172	2,31	1,35	21
351	N8CC_1061_02:07	194	170	174	174	173	2,31	1,34	21
367	N8CC_1062_09:53	194	170	176	174	173	3,06	1,76	21
353	N8CC_1061_06:16	194	174	172	177	174	2,52	1,44	20
310	N8CC_0134_02:25	199	173	175	176	175	1,53	0,87	24
354	N8CC_1061_07:27	196	178	173	175	175	2,52	1,44	21
311	N8CC_0134_09:44	197	174	175	177	175	1,53	0,87	22
299	N8CC_9330_22:15	199	175	175	177	176	1,15	0,66	23
358	N8CC_1061_23:24	195	175	174	179	176	2,65	1,50	19
291	N8CC_9188_05:54	201	177	179	180	179	1,53	0,85	22
350	N8CC_1060_BB32	198	175	178	180	178	2,52	1,42	20
291	N8CC_9188_05:54	201	177	179	180	179	1,53	0,85	22
340	N8CC_0324_09:23	191	183	178	178	180	2,89	1,61	11
332	N8CC_0324_04:56	203	180	181	183	181	1,53	0,84	22
337	N8CC_0324_08:15	201	181	186	183	183	2,52	1,37	18
342	N8CC_0345_22:45	199	186	186	179	184	4,04	2,20	15
336	N8CC_0324_08:00	202	183	182	188	184	3,21	1,74	18
292	N8CC_9189_13:12	217	184	184	185	184	0,58	0,31	33
363	N8CC_1062_05:15	197	187	179	185	184	4,16	2,27	13
343	N8CC_0346_00:47	202	189	196	187	191	4,73	2,48	11
339	N8CC_0324_08:48	203	191	185	192	189	3,79	2,00	14
274	N8CC_21-03_A10	220	200	205	198	201	3,61	1,79	19



$$R^2 = 0,930$$

Curva de Validação  
Limites de Tolerância (95%)  
 $Y=X$

## PROCESSAMENTO ESTATÍSTICO DAS AMOSTRAS DE VALIDAÇÃO NO PROGRAMA Q-STAT

### • AVALIAÇÃO DA PRECISÃO – REPETIBILIDADE DE VÁRIAS AMOSTRAS

*Tabela 37 - Resultados de Precisão do Programa Q-Stat, para o Modelo 1.*

	Unidades	Número de Amostras	Gama de Concentração		Avaliação de Repetibilidade			
			Min	Máx	SD(r)	CV(r) [%]	r	r% [%]
Cálcio	mg/100g	25	350	440	5,68	1,5	15,73	4,0
Ferro	mg/100g	25	5,44	9,85	0,43	5,6	1,20	15,5

*Tabela 38 - Resultados de Precisão do Programa Q-Stat, para o Modelo 2.*

	Unidades	Número de Amostras	Gama de Concentração		Avaliação de Repetibilidade			
			Min	Máx	SD(r)	CV(r) [%]	r	r% [%]
Cálcio	mg/100g	25	137	180	4,55	2,9	12,61	8,2
Ferro	mg/100g	25	4,97	5,62	0,30	5,6	0,83	15,5

*Tabela 39 - Resultados de Precisão do Programa Q-Stat, para o Modelo 3.*

	Unidades	Número de Amostras	Gama de Concentração		Avaliação de Repetibilidade			
			Min	Máx	SD(r)	CV(r) [%]	r	r% [%]
Cálcio	mg/100g	25	158	201	3,18	1,8	8,81	5,0
Ferro	mg/100g	25	4,50	8,93	0,24	3,5	0,68	9,7

### • AVALIAÇÃO DA VERACIDADE

#### DIFERENÇA SISTEMÁTICA

*Tabela 40 - Avaliação da diferença sistemática para o Modelo 1.*

	Unidades	Número de Amostras	Gama de Concentração		Análise das Diferenças		
			Min	Máx	Mediana	Desvio Padrão SD(d)	Intervalo Conf. 95% Inclui o zero?
Cálcio	mg/100g	25	350	440	-4,000	8,945	S
Ferro	mg/100g	25	1,10	11,34	0,500	0,644	N

**Tabela 41 - Avaliação da diferença sistemática para o Modelo 2.**

	Unidades	Número de Amostras	Gama de Concentração		Análise das Diferenças		
			Min	Máx	Mediana	Desvio Padrão SD(d)	Intervalo Conf. 95% Inclui o zero?
Cálcio	mg/100g	25	45	435	-11,000	9,541	N
Ferro	mg/100g	25	1,44	10,23	0,025	0,394	S

**Tabela 42 - Avaliação da diferença sistemática para o Modelo 3.**

	Unidades	Número de Amostras	Gama de Concentração		Análise das Diferenças		
			Min	Máx	Mediana	Desvio Padrão SD(d)	Intervalo Conf. 95% Inclui o zero?
Cálcio	mg/100g	25	98	201	-20.000	4,770	N
Ferro	mg/100g	25	4,50	11,64	0,170	0,262	N

## DIFERENÇA PROPORCIONAL

**Tabela 43 - Avaliação da diferença proporcional para o Modelo 1**

	Unidades	Número de Amostras	Gama de Concentração		Declive		Intercepção		R <sup>2</sup>	SEP	SEP/ SEC
			Min	Máx	Valor Central	Intervalo Conf. 95% inclui o 1?	Valor Central	Intervalo Conf. 95% Inclui o zero?			
Cálcio	mg/100g	25	350	440	0,980	S	4,112	S	0,894	8,570	1,081
Ferro	mg/100g	25	1,10	11,34	1,036	S	0,275	S	0,947	0,799	1,229

**Tabela 44 - Avaliação da diferença proporcional para o Modelo 2**

	Unidades	Número de Amostras	Gama de Concentração		Declive		Intercepção		R <sup>2</sup>	SEP	SEP/ SEC
			Min	Máx	Valor Central	Intervalo Conf. 95% inclui o 1?	Valor Central	Intervalo Conf. 95% Inclui o zero?			
Cálcio	mg/100g	25	45	435	0,981	S	-6,937	S	0,984	14,073	1,460
Ferro	mg/100g	25	1,44	10,23	0,922	S	0,386	S	0,951	0,428	1,034

**Tabela 45 - Avaliação da diferença proporcional para o Modelo 3**

	Unidades	Número de Amostras	Gama de Concentração		Declive		Intercepção		R <sup>2</sup>	SEP	SEP/ SEC
			Min	Máx	Valor Central	Intervalo Conf. 95% Inclui o 1?	Valor Central	Intervalo Conf. 95% Inclui o zero?			
Cálcio	mg/100g	25	98	201	0,948	S	-9,134	S	0,930	19,811	3,372
Ferro	mg/100g	25	4,50	11,64	1,039	S	-0,096	S	0,982	0,314	1,266

## AVALIAÇÃO DA INCERTEZA DO MÉTODO

*Tabela 46 - Resultados da medida da incerteza para o Modelo 1*

	Unidades	SD(r)	SD(d)	Incerteza de Referência u	Incerteza expandida U
Cálcio	mg/100g	5,68	8,945	10,60	21,19
Ferro	mg/100g	0,43	0,644	0,77	1,55

*Tabela 47 - Resultados da medida da incerteza para o Modelo 2*

	Unidades	SD(r)	SD(d)	Incerteza de Referência u	Incerteza expandida U
Cálcio	mg/100g	4,55	9,541	10,57	21,14
Ferro	mg/100g	0,30	0,394	0,50	0,99

*Tabela 48 - Resultados da medida da incerteza para o Modelo 3*

	Unidades	SD(r)	SD(d)	Incerteza de Referência u	Incerteza expandida U
Cálcio	mg/100g	3,18	4,770	5,73	11,47
Ferro	mg/100g	0,24	0,262	0,36	0,71





# CAPÍTULO 4

## MONITORIZAÇÃO DO MÉTODO

### 4.1. MONITORIZAÇÃO DO MODELO 1 DE CALIBRAÇÃO

#### 4.1.1. AMOSTRAS DIÁRIAS ANALISADAS PELO MÉTODO DE REFERÊNCIA E MÉTODO ALTERNATIVO

Nas tabelas seguintes estão registados os valores obtidos de cálcio e ferro de amostras de Farinha Láctea com frutos e Farinha Láctea simples, que foram usadas para monitorizar a performance do modelo 1 de calibração para estes produtos.

*Tabela 49 – Resultados de cálcio da farinha láctea com frutos.*

Código da Amostra	Data	AAS					XRF				
		Repl. 1	Repl. 2	Média	SD (r)	RSD (r)	Repl. 1	Repl. 2	Média	SD (r)	RSD (r)
C5F_1084_BB3	25-03-2011	445	440	443	3,54	0,80	453	452	453	0,71	0,16
C5F_1085_BB35	26-03-2011	447	451	449	2,83	0,63	449	449	449	0,00	0,00
C5F_1086_BB11	27-03-2011	456	454	455	1,41	0,31	437	437	437	0,00	0,00
C5F_1105_22:43	15-04-2011	402	404	403	1,41	0,35	404	403	404	0,71	0,18
C5F_1113_15:19	23-04-2011	402	401	402	0,71	0,18	399	402	401	2,12	0,53
C5F_1114_BB7	24-04-2011	442	437	439	3,54	0,81	429	431	430	1,41	0,33
C5F_1136_17:06	16-05-2011	352	349	351	2,12	0,60	376	377	377	0,71	0,19
C5F_1137_06:22	17-05-2011	379	373	376	4,24	1,13	405	408	407	2,12	0,52
C5F_1159_BB3	08-06-2011	393	395	394	1,41	0,36	410	410	410	0,00	0,00
C5F_1160_BB	09-06-2011	391	393	392	1,41	0,36	396	394	395	1,41	0,36
C5F_1161_06:03	10-06-2011	381	391	386	7,07	1,83	379	375	377	2,83	0,75

Tabela 50 – Resultados de ferro da farinha láctea com frutos.

Código da Amostra	Data	AAS					XRF				
		Repl. 1	Repl. 2	Média	SD (r)	RSD (r)	Repl. 1	Repl. 2	Média	SD (r)	RSD (r)
C5F_1084_BB3	25-03-2011	6,76	6,76	6,76	0,00	0,00	7,93	8,04	7,99	0,08	0,97
C5F_1085_BB35	26-03-2011	7,45	7,45	7,45	0,00	0,00	8,37	8,49	8,43	0,08	1,01
C5F_1086_BB11	27-03-2011	8,21	8,18	8,20	0,02	0,26	7,60	7,54	7,57	0,04	0,56
C5F_1105_22:43	15-04-2011	7,42	7,33	7,37	0,06	0,86	8,49	8,45	8,47	0,03	0,33
C5F_1113_15:19	23-04-2011	6,89	6,81	6,85	0,06	0,83	7,96	8,08	8,02	0,08	1,06
C5F_1114_BB7	24-04-2011	7,97	7,93	7,98	0,03	0,35	7,69	7,68	7,69	0,01	0,09
C5F_1136_17:06	16-05-2011	4,70	4,64	4,67	0,04	0,91	4,95	5,01	4,98	0,04	0,85
C5F_1137_06:22	17-05-2011	7,70	7,57	7,64	0,09	1,20	7,93	8,00	7,97	0,05	0,62
C5F_1159_BB3	08-06-2011	8,60	8,67	8,63	0,05	0,57	8,17	8,28	8,23	0,08	0,95
C5F_1160_BB	09-06-2011	6,88	6,86	6,87	0,01	0,21	7,78	7,80	7,79	0,01	0,18
C5F_1161_06:03	10-06-2011	7,16	7,07	7,12	0,06	0,89	7,93	7,86	7,90	0,05	0,63

Tabela 51 – Resultados de cálcio da farinha láctea simples.

Código da Amostra	Data	AAS					XRF				
		Repl. 1	Repl. 2	Média	SD (r)	RSD (r)	Repl. 1	Repl. 2	Média	SD (r)	RSD (r)
CS_1115_05:09	25-04-2011	406	407	406	0,71	0,17	401	397	399	2,83	0,71
CS_1116_07:14	26-04-2011	422	425	423	2,12	0,50	415	413	414	1,41	0,34
CS_1117_02:24	27-04-2011	422	424	423	1,41	0,33	412	411	412	0,71	0,17
CS_1124_18:19	04-05-2011	406	410	408	2,83	0,69	400	399	400	0,71	0,18
CS_1125_14:15	05-05-2011	423	417	420	4,24	1,01	409	409	409	0,00	0,00
CS_1126_18:02	06-05-2011	416	412	414	2,83	0,68	413	412	413	0,71	0,17
CS_1127_08:33	07-05-2011	417	417	417	0,00	0,00	416	421	419	3,54	0,84
CS_1128_14:51	08-05-2011	419	418	419	0,71	0,17	421	424	423	2,12	0,50
CS_1129_17:56	09-05-2011	412	415	413	2,12	0,51	417	421	419	2,83	0,68
CS_1130_08:46	10-05-2011	415	411	413	2,83	0,68	411	414	413	2,12	0,51
CS_1131_11:24	11-05-2011	407	409	408	1,41	0,35	408	405	407	2,12	0,52
CS_1132_23:44	12-05-2011	417	409	413	5,66	1,37	414	414	414	0,00	0,00
CS_1133_12:53	13-05-2011	411	410	411	0,71	0,17	420	419	420	0,71	0,17
CS_1134_08:55	14-05-2011	392	396	394	2,83	0,72	405	405	405	0,00	0,00
CS_1135_06:36	15-05-2011	409	409	409	0,00	0,00	409	408	409	0,71	0,17
CS_1149_20:52	29-05-2011	418	414	416	2,83	0,68	406	408	407	1,41	0,35
CS_1150_10:52	30-05-2011	423	421	422	1,41	0,34	409	409	409	0,00	0,00
CS_1151_05:13	31-05-2011	413	416	414	2,12	0,51	402	403	403	0,71	0,18
CS_1152_10:40	01-06-2011	407	408	408	0,71	0,17	404	403	404	0,71	0,18
CS_1153_19:33	02-06-2011	420	419	420	0,71	0,17	403	403	403	0,00	0,00
CS_1154_03:21	03-06-2011	426	425	425	0,71	0,17	414	413	414	0,71	0,17
CS_1155_13:34	04-06-2011	421	416	419	3,54	0,84	415	414	415	0,71	0,17
CS_1156_19:22	05-06-2011	420	421	420	0,71	0,17	415	413	414	1,41	0,34
CS_1157_03:07	06-06-2011	401	405	403	2,83	0,70	406	408	407	1,41	0,35
CS_1158_02:04	07-06-2011	403	404	404	0,71	0,18	410	410	410	0,00	0,00
CS_1165_15:19	14-06-2011	402	408	405	4,24	1,05	399	402	401	2,12	0,53
CS_1166_02:10	15-06-2011	408	410	409	1,41	0,35	397	392	395	3,54	0,90

Tabela 52 – Resultados de ferro da farinha Láctea simples.

Código da Amostra	Data	AAS					XRF				
		Repl. 1	Repl. 2	Média	SD (r)	RSD (r)	Repl. 1	Repl. 2	Média	SD (r)	RSD (r)
CS_1115_05:09	25-04-2011	5,45	5,68	5,57	0,16	2,92	4,62	4,57	4,60	0,04	0,77
CS_1116_07:14	26-04-2011	7,25	7,40	7,32	0,11	1,45	7,81	7,78	7,80	0,02	0,27
CS_1117_02:24	27-04-2011	7,09	7,09	7,09	0,00	0,00	7,16	7,13	7,15	0,02	0,30
CS_1124_18:19	04-05-2011	7,08	7,00	7,04	0,06	0,80	6,34	6,36	6,35	0,01	0,22
CS_1125_14:15	05-05-2011	6,63	6,49	6,56	0,10	1,51	6,03	5,94	5,99	0,06	1,06
CS_1126_18:02	06-05-2011	7,10	7,03	7,06	0,05	0,70	6,66	6,63	6,65	0,02	0,32
CS_1127_08:33	07-05-2011	6,69	6,82	6,76	0,09	1,36	5,92	5,94	5,93	0,01	0,24
CS_1128_14:51	08-05-2011	6,94	6,79	6,87	0,11	1,54	7,00	7,05	7,03	0,04	0,50
CS_1129_17:56	09-05-2011	6,02	6,13	6,07	0,08	1,28	5,48	5,43	5,46	0,04	0,65
CS_1130_08:46	10-05-2011	7,23	7,09	7,16	0,10	1,38	6,46	6,65	6,56	0,13	2,05
CS_1131_11:24	11-05-2011	7,30	7,38	7,34	0,06	0,77	6,85	6,80	6,83	0,04	0,52
CS_1132_23:44	12-05-2011	6,78	6,57	6,68	0,15	2,22	6,79	6,82	6,81	0,02	0,31
CS_1133_12:53	13-05-2011	7,37	7,44	7,40	0,05	0,67	7,10	6,97	7,04	0,09	1,31
CS_1134_08:55	14-05-2011	6,44	6,53	6,48	0,06	0,98	5,48	5,80	5,64	0,23	4,01
CS_1135_06:36	15-05-2011	4,99	5,03	5,01	0,03	0,56	5,16	5,30	5,23	0,10	1,89
CS_1149_20:52	29-05-2011	7,18	7,05	7,11	0,09	1,29	5,57	5,66	5,62	0,06	1,13
CS_1150_10:52	30-05-2011	7,01	7,34	7,17	0,23	3,25	7,08	6,97	7,02	0,08	1,11
CS_1151_05:13	31-05-2011	6,64	6,86	6,75	0,16	2,30	6,09	6,11	6,10	0,01	0,23
CS_1152_10:40	01-06-2011	7,49	7,09	7,29	0,28	3,88	6,40	6,35	6,37	0,04	0,56
CS_1153_19:33	02-06-2011	6,45	6,43	6,44	0,01	0,22	6,86	6,91	6,88	0,04	0,51
CS_1154_03:21	03-06-2011	6,93	7,14	7,04	0,15	2,11	6,10	5,98	6,04	0,08	1,40
CS_1155_13:34	04-06-2011	6,36	6,53	6,44	0,12	1,87	6,87	6,74	6,80	0,09	1,35
CS_1156_19:22	05-06-2011	7,43	7,72	7,57	0,21	2,71	8,08	8,29	8,19	0,15	1,81
CS_1157_03:07	06-06-2011	8,17	8,19	8,18	0,01	0,17	7,70	7,72	7,71	0,01	0,18
CS_1158_02:04	07-06-2011	6,96	7,05	7,00	0,06	0,91	7,05	7,02	7,03	0,02	0,30
CS_1165_15:19	14-06-2011	9,22	9,29	9,25	0,05	0,54	7,29	7,26	7,28	0,02	0,29
CS_1166_02:10	15-06-2011	7,08	7,06	7,07	0,01	0,20	6,83	6,77	6,80	0,04	0,62

Os resultados determinados pelo método alternativo e pelo método de referência foram inseridos no Programa Q-Stat para determinar os valores de desvio padrão de repetibilidade e o desvio padrão das diferenças entre os dois métodos. Os resultados estão registados na tabela seguinte:

Tabela 53 – Valores de desvio padrão obtidos

	Cálcio	Ferro
SD(r) Alt.	25,64	1,96
SD(r) Ref.	24,45	1,41
SD(d)	8,95	0,64

No módulo de monitorização da Calibração do Q-Stat, inseriram-se estes valores e o programa determinou os limites de perigo, os limites de controlo e os limites CUSUM.

Em seguida apresento as cartas de controlo para dois produtos do modelo 1.

### 4.1.2. CARTAS DE CONTROLO

Limite de Controlo: 23,05  
Limites de Perigo: 17,54  
Limites CUSUM: 44,75



Fig. 24 – Veracidade do cálcio de amostras diárias de Farinha Láctea com frutos.

Limite de Controlo: 1,66  
Limites de Perigo: 1,26  
Limites CUSUM: 3,22

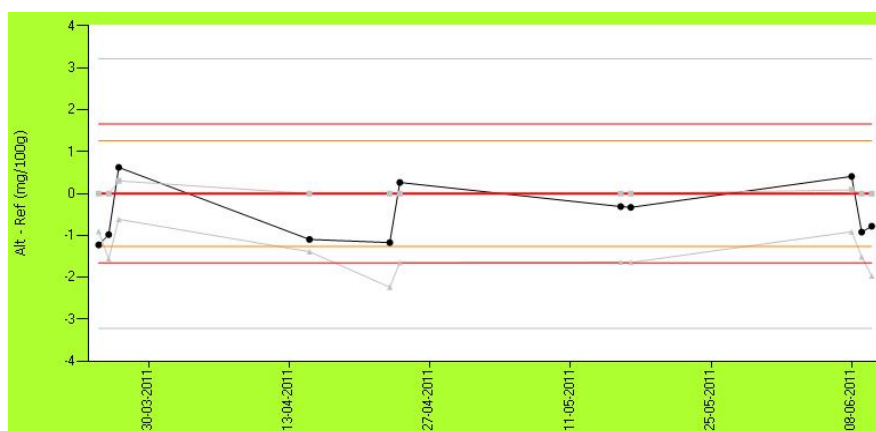


Fig. 25 – Veracidade do ferro de amostras diárias de Farinha Láctea com frutos.

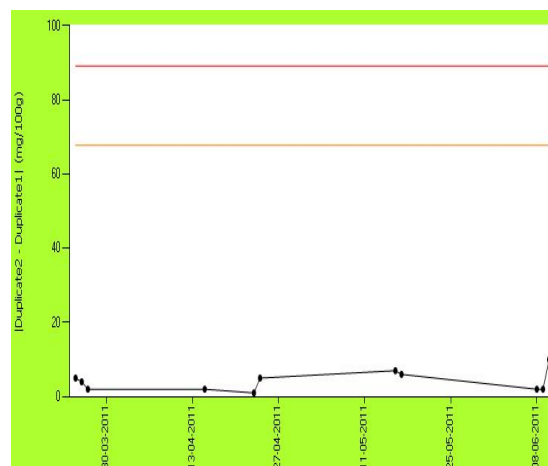
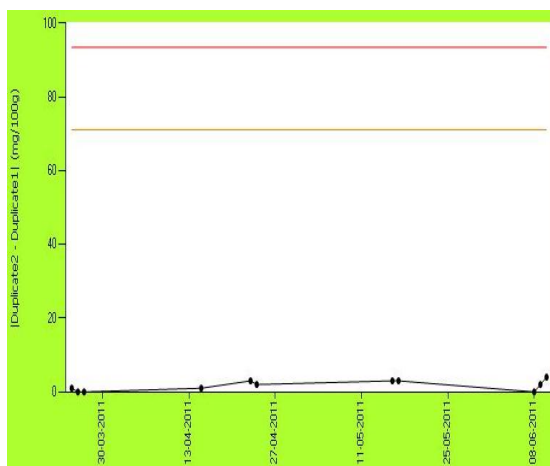


Fig. 26 – Repetibilidade para o cálcio, do método alternativo (à esquerda) e do método de referência (à direita).

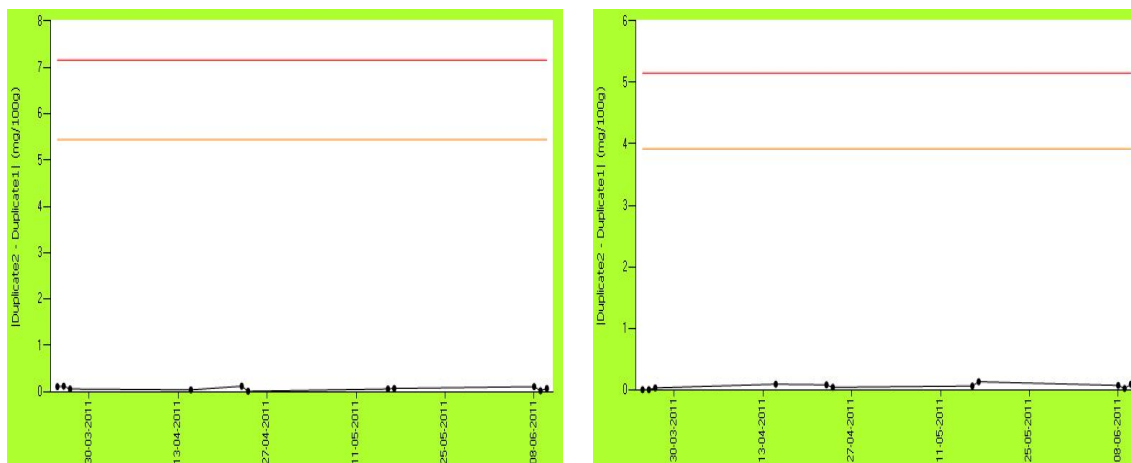


Fig. 27 – Repetibilidade do Modelo 1 para o ferro, do método alternativo (à esquerda) e do método de referência (à direita).

Na tabela seguinte estão registados os valores dos limites de controlo e de perigo da repetibilidade, para a Farinha Láctea com frutos (Figuras 26 e 27).

Tabela 54 -Valores calculados no Q-Stat para os Limites de Controlo e Limites de Perigo.

	Limites de Controlo	Limites de Perigo
Cálcio, Método Alternativo	93,51	71,08
Cálcio, Método de Referência	89,16	67,77
Ferro, Método Alternativo	7,16	5,44
Ferro, Método de Referência	5,15	3,92

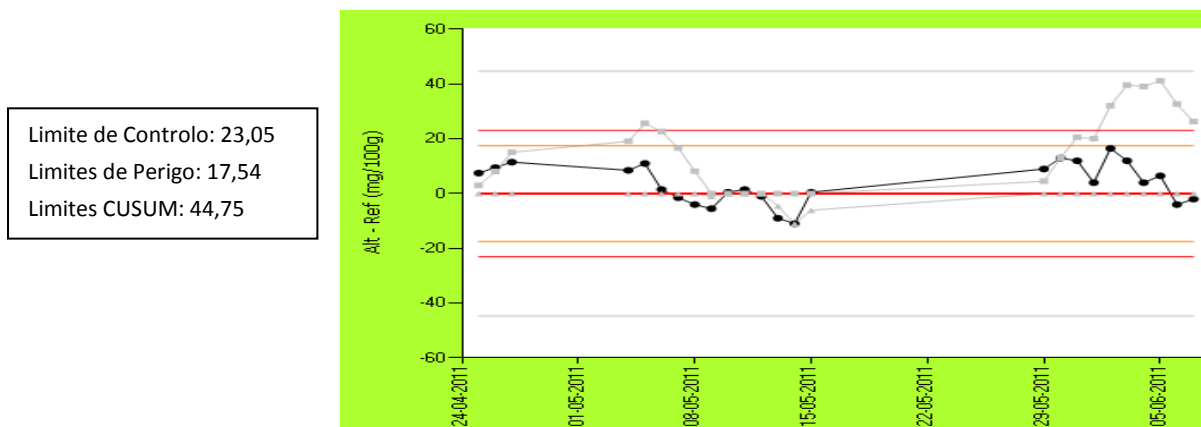


Fig. 28 - Veracidade do cálcio de amostras diárias de Farinha Láctea simples.

Limite de Controle: 1,66  
 Limites de Perigo: 1,26  
 Limites CUSUM: 3,22



Fig. 29 – Veracidade do ferro de amostras diárias de Farinha Láctea simples.

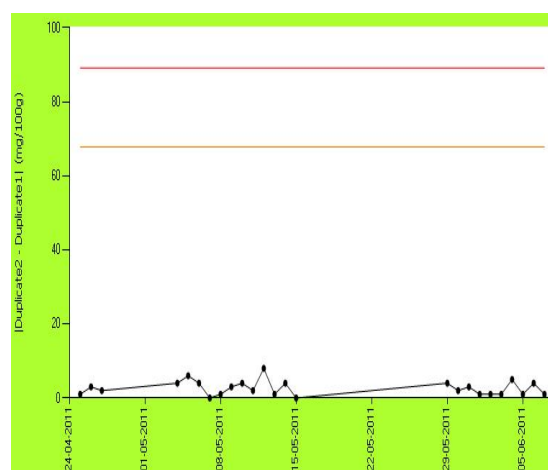
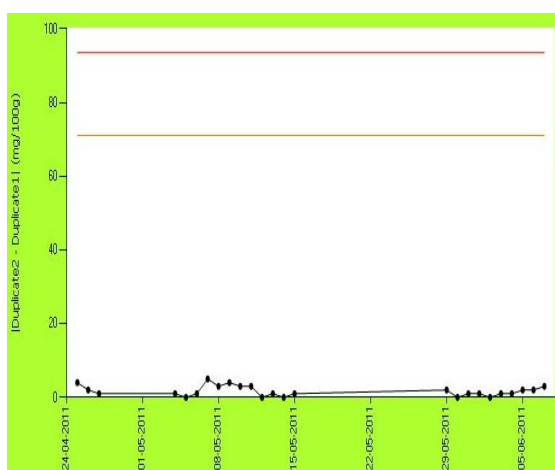


Fig. 30 – Repetibilidade para o cálcio, do método alternativo (à esquerda) e do método de referência (à direita).

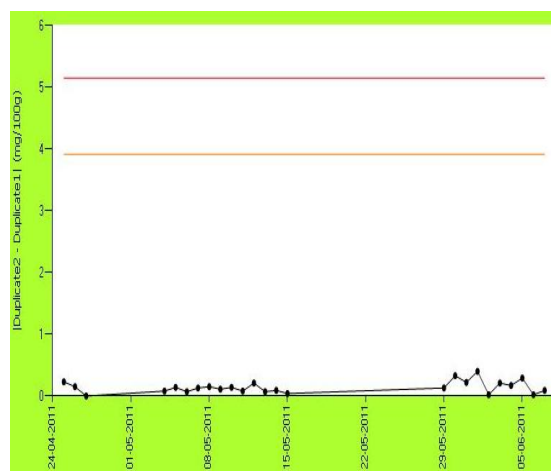
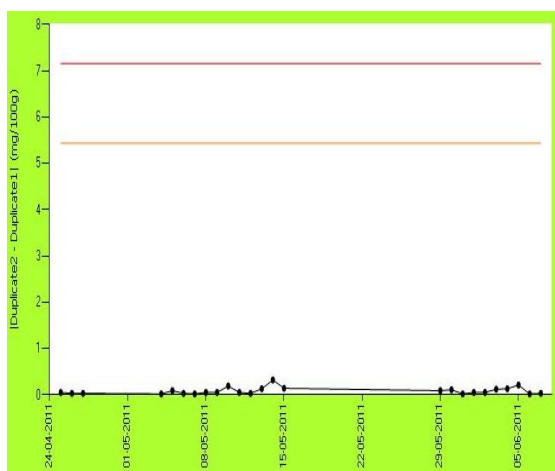


Fig. 31 – Repetibilidade do Modelo 1 para o ferro, do método alternativo (à esquerda) e do método de referência (à direita).

Na tabela seguinte estão registados os valores dos limites de controlo e de perigo da repetibilidade, para a Farinha Láctea Simples (Figuras 30 e 31).

*Tabela 55 -Valores calculados no Q-Stat para os Limites de Controlo e Limites de Perigo.*

	Limites de Controlo	Limites de Perigo
Cálcio, Método Alternativo	93,51	71,08
Cálcio, Método de Referência	89,16	67,77
Ferro, Método Alternativo	7,16	5,44
Ferro, Método de Referência	5,15	3,92

## 4.2. MONITORIZAÇÃO DO APARELHO DE XRF

### 4.2.1. AMOSTRAS ESCOLHIDAS PARA MONITORIZAÇÃO DO MINIPAL

Para a monitorização dos modelos de calibração foram escolhidas duas amostras, uma com um nível de concentração de cálcio e ferro alto e outra com um nível de concentração de cálcio e ferro baixo. Estas amostras foram analisadas em duplicado por absorção atómica e no XRF. Os resultados registados em seguida são os valores médios obtidos durante a monitorização.

*Tabela 56 – Amostras de monitorização do Modelo 1*

Número	Código da Amostra	Ferro (mg/100g)	Cálcio (mg/100g)
24	C5F_9181_10:00	2,10	401
158	CS_0127_02:14	7,30	418

## 4.2.2. RESULTADOS DE MONITORIZAÇÃO DO APARELHO DE XRF

Tabela 57 - Resultados de ferro, nível baixo, da amostra de C5F\_9181\_10:00.

	AAS	XRF	
Data	Média	Repl. 1	Repl. 2
24-05-2011	2,36	2,25	2,49
26-05-2011	2,05	1,87	1,75
01-06-2011	1,98	1,55	1,55
02-06-2011	2,21	1,93	2,00
13-06-2011	1,72	2,3	2,12
15-06-2011	2,1	2,5	2,59
17-06-2011	2,03	3,48	3,52
20-06-2011	2,26	2,1	2,07
21-06-2011	2,20	2,14	2,34

Tabela 58 - Resultados de cálcio, nível baixo, da amostra de C5F\_9181\_10:00.

	AAS	XRF	
Data	Média	Repl. 1	Repl. 2
24-05-2011	398	402	402
26-05-2011	397	413	415
01-06-2011	403	415	418
02-06-2011	403	406	408
13-06-2011	396	404	400
15-06-2011	400	399	401
17-06-2011	407	415	413
20-06-2011	406	405	399
21-06-2011	400	401	403

Tabela 59 - Resultados de ferro, nível alto, da amostra de CS\_0127\_02:14.

	AAS	XRF	
Data	Média	Repl. 1	Repl. 2
25-05-2011	4,77	7,31	7,31
26-05-2011	4,77	7,30	7,25
01-06-2011	7,98	8,69	8,83
02-06-2011	8,12	8,19	8,33
13-06-2011	8,64	6,34	6,21
15-06-2011	8,29	5,37	5,36
17-06-2011	8,17	6,39	6,43
20-06-2011	9,10	7,03	7,03
21-06-2011	8,36	7,81	7,86



Tabela 60 - Resultados de cálcio, nível alto, da amostra de CS\_0127\_02:14.

	AAS	XRF	
Data	Média	Repl. 1	Repl. 2
24-05-2011	415	407	407
25-05-2011	415	419	417
26-05-2011	415	417	415
01-06-2011	416	418	415
02-06-2011	419	417	419
13-06-2011	413	405	405
15-06-2011	417	415	419
17-06-2011	417	415	413
20-06-2011	424	412	413
21-06-2011	424	419	420

Com os resultados obtidos pelo XRF, fez-se em cada amostra um estudo de repetibilidade, para o cálcio e para o ferro. Obtiveram-se os valores do desvio padrão da repetibilidade e da reprodutibilidade intermédia.

Os resultados obtidos estão registados na tabela seguinte:

	SD(r)	SD(iR)
Ferro, nível baixo	0,09	0,42
Cálcio, nível baixo	2,10	5,57
Ferro, nível alto	0,05	1,16
Cálcio, nível alto	2,16	3,87

Estes resultados foram introduzidos no módulo de Monitorização do Q-Stat para determinar os limites de perigo, de controlo e de CUSUM.

### 4.2.3. CARTAS DE CONTROLO DA MONITORIZAÇÃO DO APARELHO DE XRF

Limite de Controlo: 13,83  
Limites de Perigo: 10,52  
Limites CUSUM: 26,84

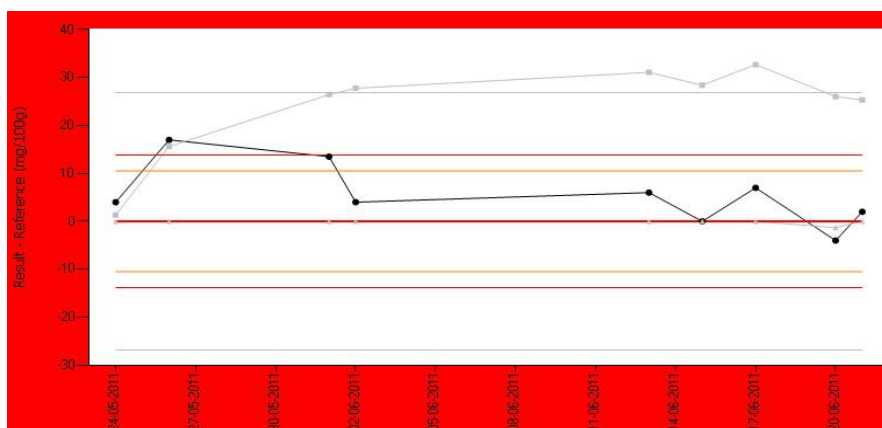


Fig. 32 – Carta de controlo da veracidade do cálcio, nível baixo.

→ As amostras do dia 26 de Maio e 1 de Julho estão fora de controlo. Nos restantes dias o processo esteve dentro de controlo.  
→ Há um desvio positivo acumulado de CUSUM que ultrapassa os limites de CUSUM.

Limite de Controlo: 1,06  
Limites de Perigo: 0,81  
Limites CUSUM: 2,06

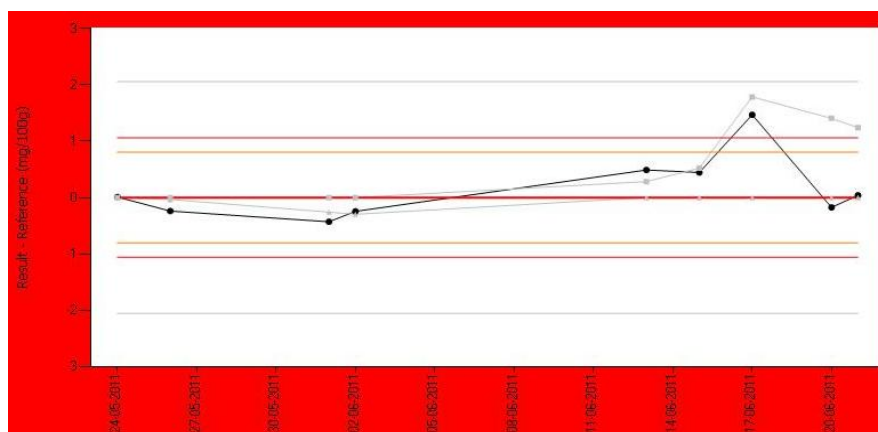


Fig. 33 – Carta de controlo da veracidade do ferro, nível baixo.

→ A amostra do dia 17 de Junho está fora de controlo. Nos restantes dias o processo esteve dentro de controlo. Poderá ser um “falso alarme”.  
→ Há um desvio positivo acumulado de CUSUM, mas este mantém-se dentro dos limites de CUSUM.

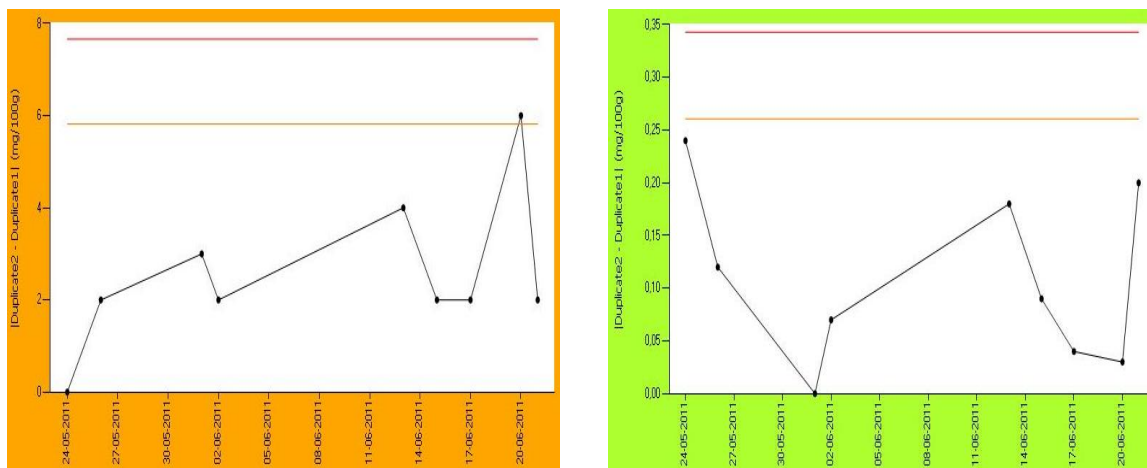


Fig. 34 – Repetibilidade para o cálcio, nível baixo (à esquerda) e do ferro, nível baixo (à direita).

Na tabela seguinte estão registados os valores dos limites de controlo e de perigo para a repetibilidade para a Farinha Láctea com Frutos (Figura 34).

Tabela 61 -Valores calculados no Q-Stat para os Limites de Controlo e Limites de Perigo.

	Limites de Controlo	Limites de Perigo
Cálcio, nível baixo	7,66	5,82
Ferro, nível baixo	0,34	0,26

Limite de Controlo: 9,21  
Limites de Perigo: 7,00  
Limites CUSUM: 17,87

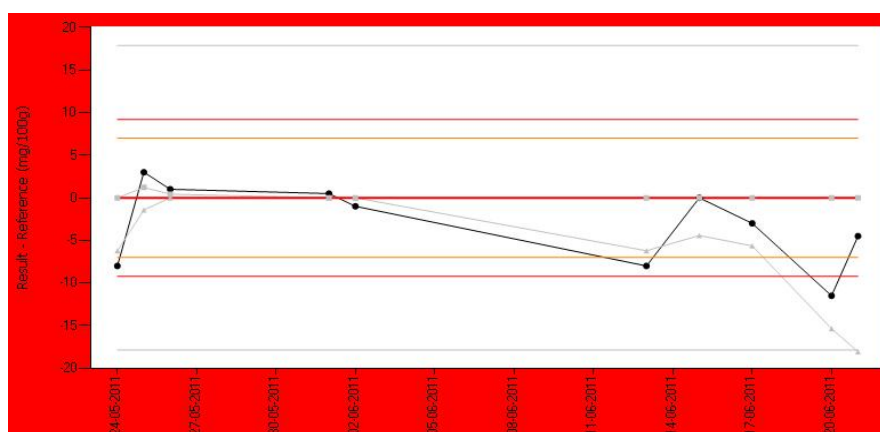


Fig. 35 - Carta de controlo da veracidade do cálcio, nível alto.

- A amostra do dia 20 de Junho está fora de controlo. Nos restantes dias o processo esteve dentro de controlo. No dia seguinte o aparelho de XRF volta a comportar-se com normalidade.
- Há um desvio negativo acumulado de CUSUM, que vai até ao limite inferior de CUSUM.

Limite de Controlo: 2,99  
 Limites de Perigo: 2,27  
 Limites CUSUM: 5,80

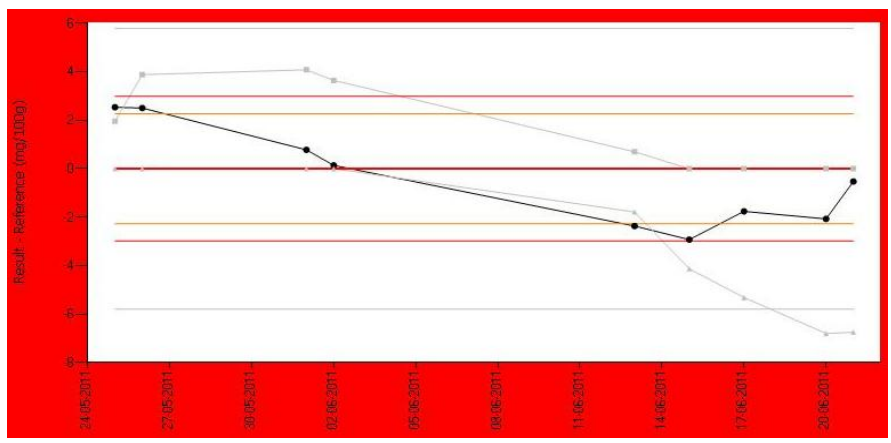


Fig. 36 – Carta de controlo da veracidade do ferro, nível alto.

→ Há ma grande variabilidade nos dias em que se analisaram as amostras  
 → Há a permanência de pequenos desvios de CUSUM positivos e negativos, que saem fora dos limites

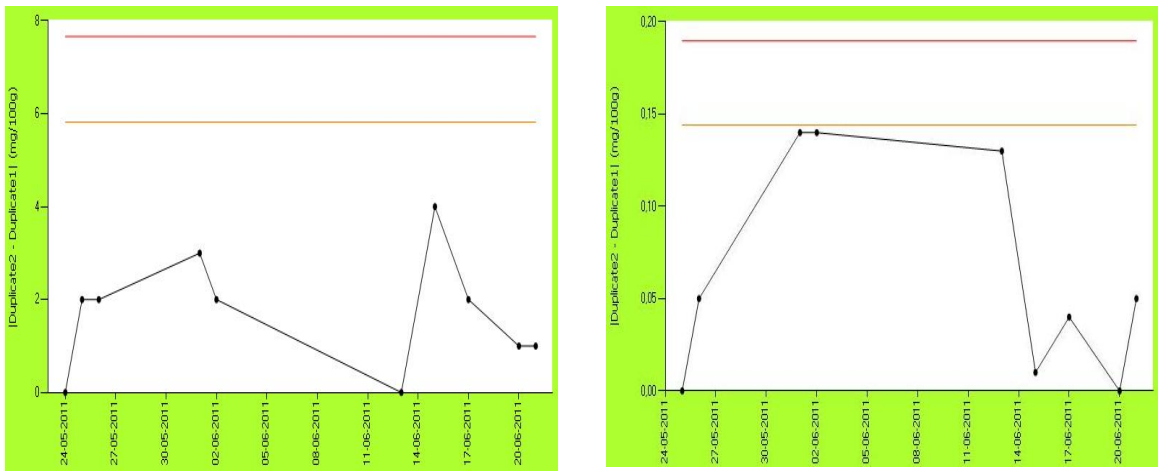


Fig. 37 – Repetibilidade para o cálcio, nível alto (à esquerda) e do ferro, nível alto (à direita).

Na tabela seguinte estão registados os valores dos limites de controlo e de perigo para a repetibilidade para a Farinha Láctea Simples (Figura 37).

Tabela 62 -Valores calculados no Q-Stat para os Limites de Controlo e Limites de Perigo.

	Limites de Controlo	Limites de Perigo
Cálcio, nível alto	7,66	5,82
Ferro, nível alto	0,19	0,14

## CAPÍTULO 5

### DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Como exposto anteriormente na introdução, há uma série de critérios que têm que ser conferidos e satisfeitos para se determinar a fiabilidade de um modelo de calibração. Na calibração verifica-se o desvio padrão relativo, as diferenças entre o valor obtido pelo método de referência e o método alternativo, a linearidade do método, a dispersão dos valores ao longo de todo o intervalo de calibração, o coeficiente de determinação  $R^2$  e também se determina o valor do Erro Padrão de Calibração (SEC) que vai ter interferência directa na aceitação do modelo de calibração.

A análise de todos os resultados e as conclusões tiradas basearam-se nos limites referenciados na instrução laboratorial da Nestlé, de Determinação de Minerais por Fluorescência de Raio-X.

#### **Verificação da linearidade do modelo de calibração**

O cálculo da média do desvio padrão relativo que se obteve para todos os modelos (1,2 e 3) está de acordo com o esperado. Tendencialmente os valores do desvio padrão relativo são mais altos para o ferro (6,18; 3,36; 2,15) do que para o cálcio (1,23; 1,42; 1,23). Estes valores estão dentro de esperado, relativamente à diferença prevista entre ferro e cálcio e também rondam os valores referidos na documentação interna da Nestlé (8,6% para o ferro e 0,8% para o cálcio), para o doseamento de minerais usando a fluorescência por raio-X, salientando que no ferro têm até valores muito mais baixos.

A diferença entre os valores de referência e os valores alternativos, usando o XRF para os modelos de Calibração do Ferro, manteve-se quase sempre abaixo de 1 mg/100g, salvo raras excepções. As amostras com valores mais altos não foram rejeitadas porque não interferiram muito com os limites de controlo e com a linearidade das curvas.

No que toca à diferença de valores no cálcio para os três modelos de calibração, no modelo 1 e modelo 2 as diferenças sofreram várias oscilações, mas sempre com tendência para o valor de referência ser maior que o valor do XRF. No modelo 3 verifica-se sempre uma diferença sistemática, o que pode levar a duas interpretações. Por um lado, o aparelho de absorção atómica pode não ter sensibilidade suficiente para ler este tipo de amostras. Por outro lado, é importante fazer referência às características da matriz do produto de Farinha Não Láctea com Cacau (Modelo 3). Este não tem leite na sua composição. Além de ser difícil a sua manipulação e ter sido necessário ajustar uma pressão maior na prensa para a pastilha ficar mais compacta, também há o risco de perda de amostra. Porém, a justificação da dificuldade da manipulação é pouco plausível pois a perda de amostra só interfere com

a repetibilidade. Assim, a ausência de leite e o cacau dão características muito peculiares à matriz cuja influência não chegou a ser estudada durante o meu período de estágio. Mas é certo que poderá ter alguma influência na penetração dos raios-X e consequentemente na sua leitura no XRF. Convém referir que a tendência geral foi sempre para o valor dado pelo aparelho de absorção atômica ser maior que o aparelho de XRF, o que poderá indiciar um problema de penetração, no que toca ao cálcio.

Em relação às curvas de calibração, pode-se dizer que os pontos se encontram bem distribuídos ao longo de todo o intervalo de calibração ainda que a concentração de pontos é inevitável na concentração próxima do valor declarado para o produto.

Na construção do intervalo de calibração consideraram-se os valores dos limites de quantificação referidos em instruções laboratoriais da Nestlé. Para o Cálcio esse limite é 100 mg/ml e para o ferro é 3 mg/ml. Estes valores correspondem à menor concentração que é aconselhável analisar, mas não são considerados como o limite supremo de quantificação. Nalguns casos foram analisadas amostras com um valor muito inferior a esses limites mas o aparelho de XRF teve uma resposta precisa e o comportamento dessas amostras foi linear. Faz sentido usar amostras de tão baixa concentração, para que o aparelho possa dar uma resposta adequada se houver uma deficiência na adição de Carbonato de Cálcio ou Fumarato Ferroso.

As amostras especiais tiveram um papel crucial no alargamento do intervalo de calibração. Para o modelo 1 bastaram fazer-se dois tipos de amostras especiais, partindo de uma base de Farinha Láctea Simples e de uma base de Farinha Láctea com Frutos para contemplar todas as características e variabilidade da matriz.

Não foi necessário fazer nenhuma alteração à organização dos produtos pelos modelos de calibração inicialmente idealizados. A separação dos produtos consoante a presença ou ausência de leite, frutas ou cacau mostrou-se eficaz. Todos os conjuntos de amostras incluídos em cada modelo de calibração tiveram um comportamento linear e não apresentaram desvios padrão significativamente diferentes dos restantes conjuntos de amostras.

Relativamente à linearidade da curva, pode-se dizer que há uma correlação elevada (tabela 63) em todos os modelos de calibração, acima de 0,85, entre a variável independente (concentração, valor de referência em mg/100g) e a variável dependente (resposta, valor alternativo em cps), o que quer dizer a variável independente contribui em grande parte para a variação da variável dependente.

*Tabela 63 - Coeficientes de determinação de todos os modelos de Calibração.*

	<b>R<sup>2</sup></b>
Modelo 1, Cálcio	0,984
Modelo 1, Ferro	0,955
Modelo 2, Cálcio	0,996
Modelo 2, Ferro	0,980
Modelo 3, Cálcio	0,982
Modelo 3, Ferro	0,959

Além destes parâmetros também se verificou o intervalo de confiança à volta do declive, que idealmente não deve incluir o 1. O intervalo de confiança à volta da intercepção deve conter o zero, o que significa que a linha de regressão é forçada a passar na origem.

*Tabela 64 - Verificação do intervalo de confiança da calibração.*

	$R^2$	IC do declive Inclui o 1?	IC da intersecção Inclui o zero?
Modelo 1, Cálcio	0,984	X	√
Modelo 1, Ferro	0,955	√	√
Modelo 2, Cálcio	0,996	X	√
Modelo 2, Ferro	0,980	X	X
Modelo 3, Cálcio	0,959	√	X
Modelo 3, Ferro	0,982	√	X

Legenda: IC – Intervalo de Confiança

Apesar de o intervalo de confiança à volta do declive e da intercepção necessitar de ser controlado, não são critérios tão relevantes para a aceitação do modelo de calibração, como o coeficiente de determinação e a dispersão das amostras ao longo do intervalo de calibração. Se os parâmetros anteriormente mencionados estiverem controlados, então pode-se dizer que o modelo tem a performance aceitável, podemos aceitar desvios no controlo do declive e da intercepção, em relação ao que está estabelecido e passar à fase de validação do método.

### **Verificação da Validação do Modelo de Calibração**

A verificação da validação tem dois componentes: o controlo da precisão dos resultados obtidos no XRF e o controlo da veracidade entre o método de referência e o método alternativo. O controlo da precisão é importante pois estuda a relação entre os replicados e determina o seu desvio padrão e desvio padrão relativo. O controlo da veracidade relaciona os valores médios obtidos pelos dois métodos e estabelece a diferença entre eles em termos de diferença sistemática e proporcional.

Na diferença sistemática calcula-se o desvio padrão das diferenças e a média das diferenças.

Na diferença proporcional determina-se o coeficiente de determinação da curva de validação, o erro padrão de previsão (SEP) e o erro padrão de calibração (SEC).

## - Veracidade do método

A diferença proporcional determina-se pela análise de regressão. É importante garantir que a gama relativa de validação seja suficientemente alargada, para que seja considerada a diferença proporcional. Se for superior a 0,2, então consideram-se ambas as diferenças para a análise da regressão.

A tabela seguinte mostra o resultado do cálculo da gama relativa de validação.

*Tabela 65 – Gama relativa de validação para o método alternativo*

	<b>Método Alternativo</b>	<b>SEP/SEC (&lt;1,5)</b>
Modelo 1, Cálcio	0,23	1,1
Modelo 1, Ferro	0,92	1,2
Modelo 2, Cálcio	0,89	1,5
Modelo 2, Ferro	0,83	1,0
Modelo 3, Cálcio	0,50	3,4
Modelo 3, Ferro	0,62	1,3

Legenda – SEP, erro padrão de previsão; SEC, erro padrão de calibração.

A gama relativa de validação obtida para todos os modelos é superior a 0,2, logo podem-se analisar ambas as diferenças, sistemática e proporcional.

O coeficiente de determinação da validação, à semelhança do coeficiente de determinação da calibração, deve ser superior a 0,85. Todas as curvas construídas têm resultados acima desse valor, logo existe uma correlação boa entre os dois métodos. Na tabela 66 estão registados todos os valores obtidos.

O relatório gerado pelo Q-Stat dá o valor do SEP e do SEC. A razão entre estes dois valores tem que ser inferior a 1,5 e é um dos parâmetros mais importantes a considerar na análise da veracidade do método.

Analisando a tabela 65, pode-se observar que em todas as curvas de calibração se obtém uma razão inferior a 1,5, à excepção da curva de validação do modelo 3, para o cálcio em que a razão deu 3,4. Este valor pode justificar-se pela diferença sistemática de 20 mg/100g entre os valores obtidos por absorção atómica e os valores obtidos pelo aparelho de XRF.

Além da verificação das condições anteriormente referidas também se verificou se a diferença não era significativamente diferente de zero e confirmou-se que o intervalo de confiança em torno do declive incluía o 1 e o intervalo de confiança da intersecção incluía o zero.



*Tabela 66 - Análise do intervalo de confiança da validação.*

	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>IC do declive Inclui o 1?</b>	<b>IC da Intercepção Inclui o 0?</b>
Modelo 1, Cálcio	0,894	Sim	Sim
Modelo 1, Ferro	0,947	Sim	Sim
Modelo 2, Cálcio	0,984	Sim	Sim
Modelo 2, Ferro	0,951	Sim	Sim
Modelo 3, Cálcio	0,930	Sim	Sim
Modelo 3, Ferro	0,982	Sim	Sim

Legenda – IC, intervalo de confiança

#### **- Precisão do método**

Analisando a tabela 30 da página 63, a média do desvio padrão relativo para todas as amostras de validação, segue o mesmo comportamento que o que foi verificado para as amostras de calibração. A tendência é para haver um desvio padrão relativo superior para as amostras de cálcio.

A diferença entre os valores de referência e os valores do XRF para o Ferro manteve-se abaixo de 1 mg/100g. Os melhores resultados obtiveram-se para a curva de validação do ferro do Modelo 3, cuja performance foi verificada pela melhor linearidade ( $R^2 = 0,984$ ). Esta maior correlação relaciona-se com a maior quantidade de amostras analisadas para este modelo do que para os outros dois, devido à dificuldade em se obterem diferenças aceitáveis (abaixo de 20 mg/100g de diferença). Relativamente ao coeficiente de determinação para o cálcio, o valor para o modelo 3 é intermédio entre o modelo 1 e o 2 e só não é pior que o modelo 1 porque o modelo 3 tem somente um produto e há um menor número de variáveis a interferir com a performance global do método de validação. Na tabela 67 estão registados estes resultados.

*Tabela 67 - Coeficientes de determinação das curvas de validação.*

	<b>R<sup>2</sup></b>
Modelo 1, Cálcio	0,894
Modelo 1, Ferro	0,947
Modelo 2, Cálcio	0,984
Modelo 2, Ferro	0,951
Modelo 3, Cálcio	0,930
Modelo 3, Ferro	0,982

O limite de repetibilidade para os produtos de nutrição infantil em instruções laboratoriais da Nestlé, é 2,2% para o cálcio e 23,8% para o ferro ( $2,772 \times SD(r)$ ).

Observando os resultados de validação obtidos na tabela 48 e tendo em linha de conta os resultados obtidos anteriormente para os modelos de calibração, posso aferir que é difícil chegar a valores tão baixos de desvio padrão da repetibilidade e de desvio padrão relativo (%) para todos os produtos em questão. As condições implementadas no aparelho de XRF são as mesmas em todas as fábricas da Nestlé. O que muda são os aparelhos usados na determinação dos valores de referência e os aparelhos de XRF. Este facto poderá ter tido influência nos valores obtidos, visto que na manipulação das amostras foram tomados todos os cuidados.

*Tabela 68 – Desvio padrão relativo e Limite de Repetibilidade das amostras de validação.*

	<b>Distribuição Normal</b>	<b>RSD (r) %</b>	<b>Limite de Repetibilidade</b>
Modelo 1, Cálcio	Sim	1,5%	4,1%
Modelo 1, Ferro	Sim	5,6%	15,5%
Modelo 2, Cálcio	Sim	2,9%	8,2%
Modelo 2, Ferro	Sim	5,6%	15,5%
Modelo 3, Cálcio	Sim	1,8%	5,0%
Modelo 3, Ferro	Sim	3,5%	9,7%

Legenda – RSD(r), desvio padrão relativo da repetibilidade

Os valores do limite de repetibilidade para o ferro estão muito abaixo do limite (23,8%), logo pode-se aferir que as condições a serem usadas no aparelho XRF,

propostas pelo especialista da Nestlé, apresentam uma melhor performance no doseamento de ferro.

Além da verificação das condições anteriormente referidas também verifiquei se a diferença não era significativamente diferente de zero e confirmei que o intervalo de confiança em torno do declive incluía o 1 e o intervalo de confiança da intersecção incluía o zero.

De acordo com os resultados apresentados e depois da avaliação da validação anteriormente feita por mim em que tive por base informações dadas pelo especialista na Nestlé, posso dizer que os modelos 1, 2 podem ser validados para o cálcio e ferro. O modelo 3, para o cálcio não pôde ser validado devido à diferença persistente de um valor médio de 20 mg/100g que se verifica entre o valor de referência e o valor de XRF, que influencia o valor do SEP e faz com que a razão entre o SEP e o SEC seja superior a 1,5, o que não é aceitável.

Para tentar obter resultados mais credíveis que me permitissem validar o modelo 3, o procedimento seria enviar um conjunto de amostras para o centro de pesquisa da Nestlé na Suíça para fazer um estudo da matriz do produto de Farinha Não Láctea com Cacao para definir qual é o motivo da diminuição da fluorescência do analito e depois definir uma condição específica para este aparelho e para esse produto.

### **Monitorização do modelo 1 de calibração**

Relativamente à monitorização do modelo 1 de calibração, para a Farinha Láctea com Frutos e Farinha Láctea simples, os resultados de repetibilidade usando o método de referência e o método alternativo estão dentro dos limites de controlo. No que toca à veracidade todos os gráficos têm um comportamento semelhante ao gráfico representado na figura 18 da página 31, com uma variação alternada ao longo da linha central, sem se observarem comportamentos discrepantes (comportamento cíclico, ciclos recorrentes, comportamento anormal, variação excessiva ou tendência para subida ou descida). Algumas amostras analisadas têm resultados acima do limite de perigo, mas sem porem em risco o controlo do processo. Nas amostras que saíram fora dos limites de controlo, seguiram-se os procedimentos de boas práticas da Nestlé para a monitorização de métodos alternativos. A primeira acção correctiva foi repetir a análise da amostra pelo método alternativo e pelo método de referência. Os limites de controlo e de perigo mostraram-se adequados, não tendo sido necessário remover nenhuma amostra e rever os limites.

O CUSUM positivo e negativo identificou desvios positivos e negativos, sem nunca ter ultrapassado os limites de CUSUM.

### **Monitorização do aparelho de XRF**

Na monitorização do XRF escolheram-se duas amostras com níveis diferentes de cálcio e ferro e analisaram-se durante pelo menos 6 dias. Apesar de a nível de repetibilidade essas amostras demonstrarem um bom comportamento, houve alguns

dias em que os resultados saíram dos limites de controlo, o que levou a que tivessem que ser analisadas as cartas de controlo para se considerar se o processo estaria mesmo fora de controlo ou se estaria a tomar uma decisão errada, considerando então esse ponto como um “falso alarme”.

Analisando a carta de controlo da veracidade do ferro, nível baixo (figura 33), concluiu-se que se trata de um “falso alarme” pois o CUSUM positivo não ultrapassou o limite superior e as amostras analisadas posteriormente voltaram a ter resultados dentro dos limites de controlo e próximos da linha central.

No que toca aos resultados da veracidade do cálcio, nível baixo (figura 32), no dia 26 de Maio e 1 de Junho obtiveram-se resultados fora dos limites de controlo, reforçado por um desvio positivo acumulado de CUSUM fora dos limites. Porém, ficam dúvidas se se pode considerar que nesse intervalo de tempo o processo tenha estado fora de controlo, porque os pontos não foram obtidos em dias consecutivos.

Os resultados da veracidade do cálcio, nível alto (figura 35) evidenciam também um ponto fora dos limites de controlo, no dia 20 de Junho. Mas no dia seguinte o aparelho voltou a operar dentro dos limites normais.

O aparecimento de pontos fora dos limites de controlo pode acontecer com frequência conhecida e neste caso justifica-se mantê-los nas cartas de controlo. Porém, só é possível tirarmos conclusões relativamente a isto se tivermos mais amostras na carta de controlo. Além disso, todos os outros pontos da curva de calibração encontram-se com um comportamento dentro dos limites de controlo e próximo da linha central.

Para a carta de controlo do ferro, nível alto (Figura 36), também não existem pontos suficientes para se tirarem conclusões definitivas relativamente à performance do aparelho. Analisando os valores disponíveis é possível verificar que há uma grande variabilidade nos dias de análise e a permanência de pequenos desvios de CUSUM positivos e negativos, que saem fora dos limites de controlo. Observadas estas diferenças, e no caso de os resultados se manterem em análises futuras, poder-se-ia considerar a substituição desta amostra por uma outra de referência.

Face aos resultados de monitorização obtidos anteriormente, futuramente poder-se-ia começar a fazer a análise das mesmas amostras no XRF duas vezes por dia, e reservar mais duas amostras de cada dia de produção para fazer análises complementares caso ocorressem desvios aos limites de CUSUM. Ao adoptar este procedimento seria possível detectar com maior precisão erros de leitura (causa mais frequente de desvio aos limites) e comprovar se os resultados de referência determinados posteriormente estariam em linha com os resultados analíticos obtidos pelo XRF.

# CAPÍTULO 6

## CONCLUSÃO

A utilização de um aparelho de fluorescência de raio-X como método alternativo para o doseamento de minerais tem vantagens relativamente à metodologia clássica por absorção atômica, por ser muito mais rápido de obter um resultado e a manipulação ser muito mais facilitada, podendo esta análise ser realizada continuamente na linha de produção por um operador treinado, durante a sua rotina diária.

A divisão dos produtos de Nutrição Infantil por grupos, de acordo com a presença ou ausência de leite, frutas e cacau, mostrou-se eficaz o que ficou demonstrado pela elevada linearidade e correlação das curvas construídas.

A criação de amostras especiais por adição crescente de ferro e cálcio às bases dos produtos veio expandir e preencher melhor o intervalo de concentração das curvas de calibração tornando-as mais robustas.

A validação dos modelos de calibração assegurou que os modelos de calibração implementados se ajustam à análise de Cálcio e Ferro, conclusão que é reforçada pelas pequenas diferenças verificadas entre o método de referência e o método alternativo, acompanhadas por resultados estatísticos dentro do esperado.

A exceção foi o produto de Farinha Não Láctea com Cacau, que apresentou uma diferença persistente entre o valor obtido para o Cálcio pelo método alternativo e pelo método de referência. Por esta razão não foi possível validar o modelo de calibração. O sucesso da validação passa por fazer um estudo exaustivo da matriz e alterar as condições do aparelho de XRF para este operar com uma melhor sensibilidade e precisão para o produto em questão.

A monitorização do modelo 1 de calibração verifica que esta se ajusta aos produtos mais importantes do grupo 1. Esta monitorização será estendida aos outros modelos para se controlar e se verificar a eficácia da calibração e a performance do aparelho de medição alternativa de Cálcio e Ferro, Minipal 4.



# BIBLIOGRAFIA

Todas as referências bibliográficas referidas em seguida foram consultadas desde Setembro de 2010 a Julho de 2011.

- [1] Directive 2002/46/EC of the European Parliament and of the Council - Approximation of the laws of the member states relating to food supplements, 10 June 2002.
- [2] European Commission, Discussion Paper on the setting of maximum and minimum amounts for vitamins and minerals in foodstuffs, Health & Consumer Protection Directorate-General, June 2006; p. 8,10, 12.
- [3] European Commission Guidance - Administrative guidance on submissions for safety evaluation of substances added for specific nutritional purposes in the manufacture of foods, Health & consumers directorate-general, 2006; p. 3.
- [4] European Commission, Regulation (EC) 1925/2006, Addition of vitamins and minerals and of certain other substances to foods. 20 December 2006; p. 27, 28, 35-37.
- [5] Perring L, Andrey D. ED-XRF as a tool for rapid minerals control in milk-based products. Journal of agricultural and food chemistry 2003; p. 4207-4012.
- [6] Perring L, Andrey D, Basic-Dvorzak M, Blanc J. Rapid multimineral determination in infant cereal matrices using wavelength dispersive X-ray fluorescence. Journal of agricultural and food chemistry 2005; p. 4696-4700.
- [7] Addition of Nutrients to Food: Nutritional and Safety Considerations, ILSI Europe Report Series, 2001; p. 5,12-13, 16.
- [8] Horiba. Introduction to XRF Spectroscopy. Disponível em: <http://www.horiba.com/scientific/products/x-ray-fluorescence-analysis/tutorial/>
- [9] Allen L, Benoist Bd, Dary O, Hurrell R. Guidelines on food fortification with micronutrients. 2006; p. 13, 24, 43-48, 84-86, 97-110, 131.
- [10] Calcium in Nutrition, ILSI Europe Concise Monograph Series, International Life Sciences Institute, ILSI Press, 1999; p. 5,15,21-23,34,42.
- [11] StatSoft Electronic Statistics Textbook - Basic Statistics. Disponível em: <http://www.statsoft.com/textbook/basic-statistics/>
- [12] Bruker. An Overview of XRF Basics. Disponível em: [http://www.bruker-axs.de/fileadmin/user\\_upload/xrfintro/sec1\\_4.html](http://www.bruker-axs.de/fileadmin/user_upload/xrfintro/sec1_4.html)
- [13] Koletzko B. Global Standard for the Composition of Infant Formula: Recommendations of an ESPGHAN Coordinated International Expert Group. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition 2005; p. 584-599
- [14] Whiting SJ, Wood R, Kim K. Calcium supplementation. J Am Acad Nurse Pract 1997; p.187-92.
- [15] Hallberg L, Brune M, Erlandsson M, Sandberg AS, Rossander-Hulten L. Calcium: effect of different amounts on nonheme- and heme-iron absorption in humans. Am J Clin Nutr 1991; p. 112-9.

- [16] Zand N, Chowdhry BZ, Zotor FB, Wray DS, Amuna P, Pullen FS. Essential and trace elements content of commercial infant foods in the UK. *Journal of Food Chemistry* 2011.
- [17] Navarrete JM, Camacho MM, Lahuerta JM, Fito P. Iron deficiency and iron fortified foods - a review. *Food Research International* 2002; p. 225–231
- [18] Davidsson L, Galan P, Kastenmayer P, Cherouvrier F, Juillerat MA, Hercberg S, Hurrell RF. Iron bioavailability studied in infants: the influence of phytic acid and ascorbic acid in infant formulas based on soy isolate. *Pediatr Res* 1994; 3p. 816-22.
- [19] Sandberg AS. Bioavailability of minerals in legumes. *Br J Nutr* 2002;88 Suppl 3:S p. 281-5.
- [20] Espectroscopia com Raios-X. Disponível em: <http://www.ufv.br/dpf/320/RaiosX.pdf>
- [21] Akhtar S, Anjum FM, Anjum MA. Micronutrient fortification of wheat flour: Recent development and strategies, *Food Research International* 2011; p. 652–659.
- [22] Perring L, Blanc J. EDXRF determination of iron during infant cereals production and its fitness for purpose. *International Journal of Food Science & Technology*. 2007; p. 551–555
- [23] SP9 Series Atomic Absorption Spectrophotometers Users Manual: Pye Unicam Cambridge England.
- [24] SP9 Computer Users manual 4013 229 97571 S&I: Pye Unicam Ltd - A scientific instrument company of Philips.
- [25] Pereira FM, Pereira-Filho ER, Bueno MI. Development of a methodology for calcium, iron, potassium, magnesium, manganese, and zinc quantification in teas using X-ray spectroscopy and multivariate calibration. *Journal of agricultural and food chemistry* 2006; p. 5723-5730.
- [26] [learnxrf.com](http://www.learnxrf.com). Introduction to X-Ray Fluorescence Analysis. Disponível em: [www.learnxrf.com/powerpointpresentations/Basicxrf.ppt](http://www.learnxrf.com/powerpointpresentations/Basicxrf.ppt)
- [27] Belmonte EdP. Espectrometria por Fluorescência de Raios-X por reflexão total: Um estudo simulado utilizando o método de Monte Carlo. Rio de Janeiro, 2005; p. 35-43, 52-54, 56-57.
- [28] PANalytical. Minipal 4 User's Guide; p. 14, 67-69 102
- [29] Saracoglu S, Saygi KO, Uluzozlu OD, Tuzen M, Soylak M. Determination of trace element contents of baby foods from Turkey *Food Chemistry* 2007; p. 280–285
- [30] PANalytical. X-ray Fluorescence serves up perfect food analysis. *GIT Laboratory Journal*, 2005.
- [31] Universidade Federal de Viçosa, Espectroscopia com raios-X. Disponível em: <http://www.ufv.br/dpf/320/RaiosX.pdf>
- [32] Rodrigues J. Espectroscopia de Raio-X. 2005. Disponível em: [http://www3.uma.pt/jrodrigues/disciplinas/MIA/Teorica/ERXC2\\_05.pdf](http://www3.uma.pt/jrodrigues/disciplinas/MIA/Teorica/ERXC2_05.pdf)



- [33] Willis J. The development of the nitrous oxide-acetylene flame for atomic absorption spectroscopy — a personal account. *Spectrochimica acta Part B: Atomic spectroscopy* 1997.
- [34] Engineer Statistics Handbook - Instrument Calibration. Disponível em: <http://www.itl.nist.gov/div898/handbook/mpc/section3/mpc36.htm>
- [35] Feser, V., Pia, M. Robust Methods for the Analysis of Income Distribution, Inequality and Poverty; p. 24.
- [36] ASTM. Standard Practices for Infrared Multivariate Quantitative Analysis. 2006; p. 13, 18.
- [37] Daintith J. A Dictionary of Computing. 2004 (Resumo)
- [38] Vandervieren E. The Use of Robust Statistics. 2008.
- [39] MLS-1200 Mega Microwave Digestion System with MDR Technology Operation Manual: MILESTONE.
- [40] Aceto M, Abollino O, Bruzzoniti MC, Mentasti E, Sarzanini C, Malandrino M. Determination of metals in wine with atomic spectroscopy (flame-AAS, GF-AAS and ICP-AES); a review. *Food additives and contaminants* 2002; p. 126-33.
- [41] Blanc J, Populaire S, Perring L. Rapid identification of inorganic salts using energy dispersive X-ray fluorescence. *Anal Sci* 2005; p. 795-798.
- [42] de Man, JM. Principles of Food Chemistry: Aspen Publishers, Inc., 1999.
- [43] Denker R., Oosten-Nienhuis N., Meier R. Sample preparation for X-ray analysis. *Globalcement MAGAZINE*, 2008.
- [44] Enzweiler, J. Espectrometria de Fluorescência de Raios X. 2010.
- [45] Fellows, PJ. Food Processing Technology - Principles and Practice: WoodHead Publishing Limited, 2000.
- [46] Figueiredo FODS. Controlo estatístico da qualidade e métodos robustos. Aveiro: Universidade de Aveiro, 2002; p. 295.
- [47] Gropper SS, Smith JL, Groff JL. Advanced Nutrition and Human Metabolism: Thomson Wardsworth, 2005.
- [48] Heritier S. Robust Methods in Biostatistics: Wiley, 2009.
- [49] Huber PJ, Ronchetti E, M. Robust Statistics: John Wiley & Sons, 2009.
- [50] Maronna RA, Martin D, Yohai VJ. Robust Statistics : Theory and Methods: John Wiley & Sons, 2006.
- [51] Melo R, Gellein K, Evje L, Syversen T. Minerals and trace elements in commercial infant food. *Food Chem Toxicol* 2008; p. 3339-3342.
- [52] Mengesha M. Band Deconvolution and Fluorescence Quenching Methods ofr determination of Caffeine Content in Cofee Seed. Physics. Addis Ababa: Addis Ababa University, 2006.
- [53] Nilva ARP, Oliveira Ed, Cadore S. Study of the mineral content of chocolate flavoured beverages. *Journal of Food Chemistry* 2006.

- [54] Pereira M, Arruda M. Trends in Preconcentration Procedures for Metal Determination Using Atomic Spectrometry Techniques Chemistry and Materials Science 2002.
- [55] Perring L, Andrey D. Wavelength-dispersive x-ray fluorescence measurements on organic matrices: application to milk-based products. X-Ray Spectrometry 2003.
- [56] Perring L, Andrey D, Basic-Dvorzak M, Hammer D. Rapid quantification of iron, copper and zinc in food premixes using energy dispersive X-ray fluorescence Journal of Food Composition and Analysis 2005.
- [57] Perring L, Blanc J. Faster Measurement of Minerals in Milk Powders: Comparison of a High Power Wavelength Dispersive XRF System with ICP-AES and Potentiometry Reference Methods Food Anal Methods 2008.
- [58] Perring L, Blanc J. Validation of quick measurement of mineral nutrients in milk powders: comparison of energy dispersive X-ray fluorescence with inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy and potentiometry reference methods Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety 2008.
- [59] Perring L, Monard F. Improvement of Energy Dispersive X-Ray Fluorescence Throughput: Influence of Measuring Times and Number of Replicates on Validation Performance Characteristics Food Analytical Methods 2009.
- [60] Pires AM, Branco JA. Introdução aos métodos estatísticos robustos: SPE, 2007.
- [61] R.A. F, Yates F. Statistical tables for biological, agricultural and medical research: Oliver and Boyd, Edinburgh, 1963.
- [62] Redovnikovic IR, Delonga K, Mazor S, Dragovic-Uzelac V, Caric M, Volkapic-Furac J. Polyphenolic Content and Composition and Antioxidative Activity of Different Cocoa Liquors. Czech Journal of Food Sciences 2009; p. 335-7.
- [63] Sandstrom B. Micronutrient interactions: effects on absorption and bioavailability. Br J Nutr 2001;85 Suppl 2:S p.181-5.
- [64] Skoog DA, West DM. Principles of Instrumental Analysis: Saunders College 1980.
- [65] Scientific Committee on Food, Opinion on substances for nutritional purposes which have been proposed for use in the manufacture of foods for particular nutritional purposes ('parnuts'), 1999
- [66] Kuratomi RI, Malta LG, Shigematsu RM, Pastore GM, Coroa TM. Avaliação do potencial antioxidante de frutas do cerrado. Disponível em: <http://www.prp.unicamp.br/pibic/congressos/xvicongresso/paineis/046089.pdf>
- [67] Commission directive 2006/125/EC of 5 december 2006, Processed cereal-based foods and baby foods for infants and young children, 6 December 2006.

# **ANEXOS**



Tabela 69 - Resultados de referência para o Grupo 1, obtidos por Absorção Atômica.

Número	Código da Amostra	CÁLCIO					FERRO				
		Replicado 1	Replicado 2	Média	SD (r)	RSD (r)	Replicado 1	Replicado 2	Média	SD (r)	RSD (r)
1	C5F_Base	55	54	55	0,57	1,03	0,84	0,82	0,83	0,01	1,70
2	C5F_A1	327	325	326	1,41	0,43	0,92	1,12	1,02	0,14	13,86
3	C5F_A2	330	330	330	0,00	0,00	1,29	1,27	1,28	0,01	1,10
4	C5F_A4	344	344	344	0,00	0,00	2,72	2,68	2,70	0,03	1,05
5	C5F_A6	364	363	363	0,71	0,19	4,27	4,30	4,29	0,02	0,49
6	C5F_A8	382	377	379	3,54	0,93	5,86	5,75	5,80	0,08	1,34
7	C5F_A9	379	384	382	3,54	0,93	6,60	6,63	6,62	0,02	0,32
8	C5F_A10	388	390	389	1,41	0,36	7,47	7,32	7,39	0,11	1,44
9	C5F_A11	405	402	404	2,12	0,53	9,68	9,29	9,49	0,28	2,91
10	C5F_A12	416	428	422	8,49	2,01	10,54	10,40	10,47	0,10	0,95
11	C5F_A13	444	451	447	4,95	1,11	11,54	11,39	11,46	0,11	0,93
12	C5F_A14	448	448	448	0,00	0,00	12,61	12,65	12,63	0,03	0,22
13	C5F_A16	491	496	494	3,54	0,72	15,27	15,40	15,33	0,09	0,60
14	C5F_A18	512	519	515	4,95	0,96	18,28	18,42	18,35	0,10	0,54
15	C5F_A18.5	524	524	524	0,00	0,00	19,59	19,04	19,31	0,39	2,01
16	C5F_A19	549	535	542	9,90	1,83	20,46	20,50	20,48	0,03	0,14
17	C5F_A19.5	549	548	548	0,71	0,13	21,65	21,85	21,76	0,14	0,65
18	C5F_A20	553	549	551	2,83	0,51	24,11	23,79	23,95	0,23	0,94
19	C5F_A20.5	547	559	553	8,48	1,53	26,30	26,22	26,26	0,06	0,22
20	C5F_A21	612	597	604	10,61	1,76	27,78	28,67	28,22	0,63	2,23
21	C5F_8314 09:04	417	417	417	0,00	0,00	7,07	6,86	6,96	0,15	2,13
22	C5F_9113 09:41	412	417	414	3,54	0,85	6,10	6,16	6,13	0,04	0,69
23	C5F_9114 03:05	415	417	416	1,41	0,34	5,31	6,72	6,02	1,00	16,56
24	C5F_9181 10:00	398	397	398	0,71	0,18	6,49	6,51	6,50	0,01	0,22
25	C5F_0085 07:29	400	400	400	0,00	0,00	7,53	7,61	7,57	0,06	0,75
26	C5F_0087 11:07	399	405	402	4,24	1,06	5,83	6,19	6,01	0,25	4,24
27	C5F_0110 10:31	411	415	413	2,83	0,68	7,55	7,49	7,52	0,04	0,56
28	C5F_0129 BB	387	389	388	1,41	0,36	7,34	7,20	7,30	0,10	1,36
29	C5F_0131 08:16	400	401	400	0,71	0,18	7,13	6,38	6,75	0,53	7,86
30	C5F_0131 14:59	395	389	392	4,24	1,08	7,05	7,32	7,18	0,19	2,66
31	C5F_0131 20:56	395	400	397	3,54	0,89	7,30	7,55	7,42	0,18	2,38
32	C5F_0132 00:43	399	405	402	4,24	1,06	7,71	7,82	7,80	0,08	1,00
33	C5F_0132 03:05	396	396	396	0,00	0,00	6,85	6,84	6,85	0,01	0,10
34	C5F_0132 04:54	387	385	386	1,41	0,37	7,65	7,60	7,62	0,04	0,46
35	C5F_0132 05:52	395	382	388	9,19	2,37	7,93	7,52	7,73	0,29	3,75
36	C5F_0155 16:46	400	402	401	1,41	0,35	6,82	6,90	6,86	0,06	0,82
37	C5F_0287 10:55	383	378	381	3,54	0,93	6,85	7,07	6,96	0,16	2,24
38	C5F_0344 06:18	400	399	399	0,71	0,18	7,50	7,39	7,45	0,08	1,04
39	CB_9181 01:00	364	365	365	0,71	0,19	2,06	2,39	2,23	0,23	10,46
40	CB_0108	390	390	390	0,00	0,00	9,86	9,85	9,86	0,01	0,07
41	CB_0156	389	388	389	0,71	0,18	7,86	7,89	7,88	0,02	0,27
42	CB_0157	387	383	385	2,83	0,73	7,26	7,23	7,24	0,02	0,29
43	CB_0285 BB15	367	369	368	1,41	0,38	6,40	6,61	6,50	0,15	2,28

44	CB_0342 BB5	378	378	378	0,00	0,00	7,64	7,56	7,60	0,06	0,74
45	CB_0343 BB6	427	422	424	3,54	0,83	8,61	8,87	8,74	0,18	2,10
46	CBL_8314 18:26	407	409	408	1,41	0,35	6,67	6,34	6,50	0,23	3,59
47	CBL_8315 05:33	393	390	391	2,12	0,54	6,16	5,90	6,03	0,18	3,05
48	CBL_9085 18:45	397	402	400	3,54	0,88	7,17	7,32	7,25	0,11	1,46
49	CBL_9138 05:05	402	397	400	3,54	0,88	6,55	6,63	6,59	0,06	0,86
50	CBL_9178 21:10	381	380	381	0,71	0,19	5,68	5,35	5,52	0,23	4,23
51	CBL_9179 05:23	374	375	375	0,71	0,19	7,62	7,60	7,61	0,01	0,19
52	CBL_9320 18:39	392	386	389	4,24	1,09	7,32	7,32	7,32	0,00	0,00
53	CBL_9321 00:31	387	390	389	2,12	0,55	7,58	7,62	7,60	0,03	0,37
54	CBL_0002 19:36	393	402	397	6,36	1,60	7,53	7,71	7,62	0,13	1,67
55	CBL_0128 21:03	404	405	405	0,71	0,17	8,20	8,30	8,25	0,07	0,86
56	CBL_0128 22:12	399	396	397	2,12	0,53	7,90	8,17	8,03	0,19	2,38
57	CBL_0128 23:12	474	467	470	4,95	1,05	9,99	9,93	9,96	0,04	0,43
58	CBL_0128 23:13	384	383	384	0,71	0,18	8,05	7,68	7,87	0,26	3,32
59	CBL_0129 05:11	382	377	380	3,54	0,93	7,45	7,70	7,57	0,18	2,34
60	CBL_0129 15:30	368	369	369	0,71	0,19	7,17	6,96	7,06	0,15	2,10
61	CBL_0129 19:27	370	373	371	2,12	0,57	7,06	7,09	7,07	0,02	0,30
62	CBL_0130 20:09	395	405	400	7,07	1,77	7,41	7,20	7,30	0,15	2,03
63	CBL_0132 13:23	411	409	410	1,41	0,34	25,77	25,78	25,78	0,01	0,03
64	CBL_0156 12:40	388	387	388	0,71	0,18	5,11	5,58	5,35	0,33	6,21
65	CBL_0261 10:24	411	410	411	0,71	0,17	7,74	7,66	7,70	0,06	0,73
66	CM_9115 17:08	437	437	437	0,00	0,00	5,59	5,69	7,62	0,07	0,93
67	CM_0109 21:39	408	408	408	0,00	0,00	7,30	7,50	7,40	0,14	1,91
68	CM_0109 23:07	364	365	365	0,71	0,19	5,58	5,58	5,58	0,00	0,00
69	CM_0132 14:39	367	358	362	6,36	1,76	7,88	7,87	7,88	0,01	0,09
70	CM_0132 14:34	365	358	362	4,95	1,37	9,49	9,41	9,45	0,06	0,60
71	CM_0132 15:00	357	352	354	3,54	1,00	10,10	10,04	10,07	0,04	0,42
72	CM_0132 15:49	371	365	368	4,24	1,15	11,01	11,20	11,10	0,13	1,21
73	CM_0132 16:47	395	399	397	2,83	0,71	18,62	19,49	19,05	0,62	3,23
74	CM_0132 17:33	353	357	355	2,83	0,80	11,52	11,42	11,47	0,07	0,62
75	CM_0132 18:02	356	355	356	0,71	0,20	12,18	12,52	12,35	0,24	1,95
76	CM_0132 19:17	371	374	372	2,12	0,57	11,59	11,52	11,55	0,05	0,43
77	CM_0156 08:40	396	395	396	0,71	0,18	7,37	7,19	7,28	0,13	1,75
78	CM_0156 09:57	380	383	382	2,12	0,56	6,83	7,39	7,11	0,40	5,57
79	CM_0156 11:13	375	375	375	0,00	0,00	5,13	5,19	5,16	0,04	0,82
80	CM_0286 22:31	391	388	390	2,12	0,54	6,38	6,01	6,19	0,26	4,23
81	CM_0342 13:55	393	391	392	1,41	0,36	6,43	6,14	6,28	0,21	3,27
82	CP_9178 17:00	365	363	364	1,41	0,39	6,74	6,85	6,80	0,08	1,14
83	CP_0132 07:31						27,84	27,58	27,71	0,18	0,66
84	CP_0132 07:32						28,13	27,12	27,63	0,71	2,58
85	CP_0132 08:01						30,01	29,72	29,86	0,21	0,69
86	CP_0132 08:45	367	352	360	10,61	2,95	33,70	33,63	33,67	0,05	0,15
87	CP_0132 08:46	365	364	365	0,71	0,19	33,88	33,68	33,78	0,14	0,42
88	CP_0132 09:11						32,57	32,83	32,70	0,18	0,56
89	CP_0132 09:19						28,25	28,37	28,31	0,08	0,30
90	CP_0132 09:40	385	385	385	0,00	0,00	29,18	29,77	29,48	0,42	1,42
91	CP_0153 01:14						7,74	7,66	7,70	0,06	0,73

92	CP_0153 01:41	380	382	381	1,41	0,37	7,00	6,98	6,99	0,01	0,20
93	CP_0153 03:30	381	383	382	1,41	0,37	8,03	8,51	8,27	0,34	4,10
94	CP_0153 04:57	390	388	389	1,41	0,36	7,95	7,84	7,89	0,08	0,99
95	CP_0153 05:43	395	407	401	8,49	2,12	7,95	7,92	7,94	0,02	0,27
96	CP_0153 06:50	387	386	386	0,71	0,18	8,13	8,16	8,14	0,02	0,26
97	CP_0242 05:37	414	414	414	0,00	0,00	7,74	7,52	7,17	0,16	2,17
98	CP_0286 09:40	391	386	389	3,54	0,91	5,87	5,98	5,93	0,08	1,31
99	CP_0286 13:53	370	373	372	2,12	0,57	5,77	5,28	5,52	0,35	6,28
100	CP_0286 16:25	368	364	366	2,83	0,77	6,62	6,09	6,36	0,37	5,89
101	CP_0286 21:31	385	384	385	0,71	0,18	7,66	7,53	7,60	0,09	1,21
102	CP_0342 18:14	376	378	377	1,41	0,38	7,25	6,74	6,99	0,36	5,16
103	CS_Base	108	107	107	0,71	0,65	1,21	0,98	1,10	0,16	14,78
104	CS_A1	363	361	362	1,41	0,39	0,66	0,75	0,70	0,06	9,09
105	CS_A1 Amostra 2	360	359	360	0,71	0,20	0,95	1,05	1,00	0,07	7,07
106	CS_A2	361	365	363	2,83	0,78	1,78	1,89	1,84	0,08	4,23
107	CS_A3	374	372	373	1,41	0,38	2,90	2,57	2,73	0,23	8,55
108	CS_A4	376	374	375	1,41	0,38	3,33	3,74	3,53	0,29	8,21
109	CS_A5	380	387	383	4,95	1,29	4,86	4,50	4,68	0,25	5,44
110	CS_A6	386	395	390	6,36	1,63	4,87	4,83	4,85	0,03	0,58
111	CS_A7	392	395	394	2,12	0,54	4,65	6,42	5,53	1,25	22,63
112	CS_A8	394	401	397	4,95	1,25	6,73	6,85	6,79	0,08	1,25
113	CS_A9	419	424	422	3,54	0,84	9,57	9,80	9,69	0,16	1,68
114	CS_A10	441	434	437	4,95	1,13	11,19	11,26	11,22	0,05	0,44
115	CS_A11	465	474	469	6,36	1,36	14,28	14,88	14,58	0,42	2,91
116	CS_A12	486	489	488	2,12	0,43	15,80	15,29	15,54	0,36	2,32
117	CS_A13	536	532	534	2,83	0,53	27,01	30,62	28,82	2,55	8,86
118	CS_A14	563	561	562	1,41	0,25	19,16	19,19	19,18	0,02	0,11
119	CS_A15	570	558	564	8,49	1,50	19,82	19,57	19,69	0,18	0,90
120	CS_A16	578	572	575	4,24	0,74	23,08	22,64	22,86	0,31	1,36
121	CS_A17	627	624	625	2,12	0,34	27,69	25,62	26,66	1,46	5,49
122	CS_A18	646	659	652	9,19	1,41	32,58	32,08	32,33	0,35	1,09
123	CS_A19	751	762	756	7,78	1,03	44,71	44,21	44,49	0,35	0,79
124	CS_A20	803	812	807	6,36	0,79	47,85	48,67	48,26	0,58	1,20
125	CS_9043	445	447	446	1,41	0,32	8,75	8,16	8,45	0,42	4,94
126	CS_9070	431	433	432	1,41	0,33	7,13	7,06	7,09	0,05	0,70
127	CS_9071	434	429	431	3,54	0,82	7,51	7,60	7,56	0,06	0,84
128	CS_9073 03:02	430	432	431	1,41	0,33	6,82	7,18	7,00	0,25	3,64
129	CS_9074 03:05	380	401	391	14,85	3,80	7,50	7,44	7,47	0,04	0,57
130	CS_9104	427	427	427	0,00	0,00	6,77	6,31	6,54	0,33	4,97
131	CS_9105	414	414	414	0,00	0,00	7,09	7,51	7,30	0,30	4,07
132	CS_9106	434	434	434	0,00	0,00	8,69	8,90	8,79	0,15	1,69
133	CS_9129	436	434	435	1,41	0,33	6,94	6,50	6,72	0,31	4,63
134	CS_9130	445	446	445	0,71	0,16	9,65	9,21	9,43	0,31	3,30
135	CS_9131 02:27	420	431	425	7,78	1,83	7,26	7,17	7,21	0,06	0,88
136	CS_9167 06:48	412	425	419	9,19	2,19	7,12	7,37	7,25	0,18	2,44
137	CS_9257	409	413	411	2,83	0,69	6,21	5,86	6,04	0,25	4,10
138	CS_9259	422	421	422	0,71	0,17	7,63	7,45	7,54	0,13	1,69
139	CS_9287	430	430	430	0,00	0,00	6,13	6,56	6,34	0,30	4,80

140	CS_9289	406	408	407	1,41	0,35	7,04	6,43	6,73	0,43	6,41
141	CS_9312	413	414	414	0,71	0,17	7,28	7,38	7,33	0,07	0,96
142	CS_9313	414	418	416	2,83	0,68	7,07	7,29	7,18	0,16	2,17
143	CS_9314	412	420	416	5,66	1,36	8,13	8,67	8,40	0,38	4,55
144	CS_9315	418	416	417	1,41	0,34	10,94	10,34	10,64	0,42	3,99
145	CS_9316	438	446	442	5,66	1,28	9,59	10,35	9,97	0,54	5,39
146	CS_9317	442	451	446	6,36	1,43	10,17	8,98	9,57	0,84	8,79
147	CS_0107 05:05	412	423	418	7,78	1,86	6,35	6,40	6,37	0,04	0,56
148	CS_0108 03:12	430	431	431	0,71	0,16	7,74	7,83	7,79	0,06	0,82
149	CS_0111 18:30	404	405	404	0,71	0,18	9,17	8,74	8,95	0,30	3,40
150	CS_0112 15:32	422	422	422	0,00	0,00	7,55	6,74	7,15	0,57	8,01
151	CS_0112 23:14	410	408	409	1,41	0,35	7,59	7,51	7,55	0,06	0,75
152	CS_0122 07:26	437	436	437	0,71	0,16	7,71	7,71	7,71	0,00	0,00
153	CS_0122 12:55	438	429	433	6,36	1,47	8,10	7,79	7,94	0,22	2,76
154	CS_0122 22:45	432	435	433	2,12	0,49	7,40	7,17	7,29	0,16	2,23
155	CS_0123 04:15	437	434	435	2,12	0,49	8,21	8,98	8,59	0,54	6,34
156	CS_0123 09:03	411	405	408	4,24	1,04	7,78	7,10	7,44	0,48	6,46
157	CS_0123 15:30	435	434	434	0,71	0,16	7,39	6,97	7,18	0,30	4,14
158	CS_0127 02:14	414	417	415	2,12	0,51	4,77	4,77	4,77	0,00	0,00
159	CS_0127 13:23	434	436	435	1,41	0,33	5,90	5,83	5,87	0,05	0,84
160	CS_0127 23:18	414	419	416	3,54	0,85	7,62	7,73	7,68	0,08	1,01
161	CS_0128 07:51	435	439	437	2,83	0,65	8,66	8,02	8,34	0,45	5,43
162	CS_0128 12:59	441	443	442	1,41	0,32	7,55	7,53	7,54	0,01	0,19
163	CS_0128 14:54	466	450	458	11,31	2,47	7,25	6,92	7,09	0,23	3,29
164	CS_0148 03:06	424	430	427	4,24	0,99	7,19	7,13	7,16	0,04	0,59
165	CS_0258 22:35	411	409	410	1,41	0,34	9,03	8,49	8,76	0,38	4,36
166	CS_0317	406	406	406	0,00	0,00	6,69	6,48	6,58	0,15	2,26
167	CS_0340 13:20	406	404	405	1,41	0,35	8,20	7,90	8,05	0,21	2,64



Tabela 70 - Resultados de referência para o Grupo 2, obtidos por Absorção Atômica

Número	Código da Amostra	CÁLCIO					FERRO				
		Replicado 1	Replicado 2	Média	SD (r)	RSD (r)	Replicado 1	Replicado 2	Média	SD (r)	RSD (r)
168	N5C_A1	48	46	47	1,27	2,71	2,67	2,61	2,64	0,04	1,61
169	N5C_A2	66	66	66	0,19	0,29	2,98	3,47	3,23	0,35	10,73
170	N5C_A4	104	104	104	0,00	0,00	4,19	4,26	4,23	0,05	1,17
171	N5C_A6	148	148	148	0,00	0,00	5,02	5,11	5,07	0,06	1,26
172	N5C_A8	191	191	191	0,00	0,00	6,13	6,09	6,11	0,03	0,46
173	N5C_A10	243	245	244	1,41	0,58	7,91	7,59	7,75	0,23	2,92
174	N5C_A11	304	312	308	5,66	1,84	9,53	8,96	9,24	0,40	4,36
175	N5C_A13	392	392	392	0,00	0,00	9,23	9,40	9,31	0,12	1,29
176	N5C_A14	431	438	434	4,95	1,14	12,45	12,54	12,49	0,06	0,51
177	N5C_A16	583	583	583	0,00	0,00	17,97	18,88	18,42	0,64	3,49
178	N5C_A18	883	852	867	21,92	2,53	23,49	22,99	23,23	0,35	1,52
179	N5C_8015 01:52	187	183	185	2,83	1,53	5,88	5,97	5,93	0,06	1,07
180	N5C_8316 16:58	165	163	164	1,41	0,86	5,73	5,18	5,46	0,39	7,12
181	N5C_9015 02:37	188	188	188	0,00	0,00	5,29	5,29	5,29	0,00	0,00
182	N5C_9037 12:41	179	177	178	1,41	0,79	5,47	4,93	5,20	0,38	7,34
183	N5C_9045 22:31	174	175	175	0,71	0,40	6,13	6,11	6,12	0,01	0,23
184	N5C_9046 04:22	177	178	178	0,71	0,40	6,37	5,17	6,27	0,85	13,53
185	N5C_9046 06:08	179	178	179	0,71	0,40	6,01	5,86	5,94	0,11	1,79
186	N5C_9047 07:25	180	180	180	0,00	0,00	5,70	6,00	5,85	0,21	3,63
187	N5C_9090 09:07	178	177	178	0,71	0,40	5,17	5,30	5,23	0,09	1,76
188	N5C_9090 23:32	176	176	176	0,00	0,00	4,66	4,67	4,66	0,01	0,15
189	N5C_9124 03:47	195	192	194	2,12	1,09	5,38	5,20	5,29	0,13	2,41
190	N5C_9141 03:24	188	188	188	0,00	0,00	4,96	5,14	5,05	0,13	2,52
191	N5C_9142 07:08	193	189	191	2,83	1,48	5,03	4,87	4,95	0,11	2,29
192	N5C_9142 22:54	185	178	182	4,95	2,72	5,26	5,19	5,23	0,05	0,95
193	N5C_9143 07:49	189	182	186	4,95	2,66	6,08	5,87	5,97	0,15	2,49
194	N5C_9195 22:16	194	193	194	0,71	0,36	5,49	5,45	5,47	0,03	0,52
195	N5C_9298 13:42	187	187	187	0,00	0,00	4,82	5,13	4,97	0,22	4,41
196	N5C_9334 23:27	191	190	191	0,71	0,37	5,47	5,38	5,42	0,06	1,17
197	N5C_9335 07:05	179	181	180	1,41	0,79	5,52	5,40	5,46	0,08	1,55
198	N5C_0114 BB11	376	379	377	2,12	0,56	7,16	7,50	7,33	0,24	3,28
199	N8CM_Base 13/01	24	23	24	0,71	2,95	1,71	1,77	1,74	0,04	2,44
200	N8CM_A1	32	30	32	1,41	4,42	1,09	1,18	1,13	0,06	5,63
201	N8CM_A2	46	47	47	0,30	0,63	1,91	1,89	1,90	0,01	0,74
202	N8CM_A4	87	82	85	3,54	4,16	2,84	3,18	3,01	0,24	7,99
203	N8CM_A6	131	130	131	0,71	0,54	4,10	4,10	4,10	0,00	0,00
204	N8CM_A8	177	176	176	0,71	0,40	5,53	5,47	5,50	0,04	0,77
205	N8CM_A10	237	237	237	0,00	0,00	7,70	7,53	7,61	0,12	1,58
206	N8CM_A12	342	344	343	1,41	0,41	10,93	11,15	11,04	0,16	1,41
207	N8CM_A14	443	430	437	9,19	2,10	14,39	15,07	14,73	0,48	3,26
208	N8CM_A16	650	636	643	9,94	1,55	19,11	18,82	18,96	0,21	1,08
209	N8CM_9050 03:10	321	324	322	2,12	0,66	5,74	5,93	5,84	0,13	2,30

210	N8CM_9097 03:15	164	163	164	0,71	0,43	5,56	5,61	5,59	0,04	0,63
211	N8CM_9148 04:32	168	164	166	2,83	1,70	5,38	5,39	5,39	0,01	0,13
212	N8CM_0101 10:14	135	140	138	3,54	2,56	3,80	3,64	3,72	0,11	3,04
213	N8CM_0116 05:21	163	159	161	2,83	1,76	5,25	5,31	5,28	0,04	0,80
214	N8CM_0117 04:19	167	167	167	0,00	0,00	5,71	5,85	5,78	0,10	1,71
215	N8CM_0118 02:52	176	172	174	2,83	1,63	6,01	6,02	6,02	0,01	0,12
216	N8CM_0119 23:06	162	164	163	1,41	0,87	5,45	5,27	5,36	0,13	2,37
217	N8CM_0139 20:14	156	159	158	2,12	1,34	5,33	5,23	5,28	0,07	1,34
218	N8CM_0141 13:40	170	170	170	0,00	0,00	5,22	5,50	5,36	0,20	3,69
219	N8CM_0142 07:17	177	178	178	0,71	0,40	5,18	5,07	5,12	0,08	1,52
220	N8CM_0143 15:58	170	170	170	0,00	0,00	5,08	5,05	5,07	0,02	0,42
221	N8CM_0144 02:25	165	168	167	2,12	1,27	4,86	4,82	4,84	0,03	0,58
222	N8CM_0193 20:15	177	174	176	2,12	1,21	5,27	5,53	5,40	0,18	3,40
223	N8CM_0248 08:45	172	172	172	0,00	0,00	5,49	5,32	5,40	0,12	2,23
224	N8CM_0300 06:48	161	162	162	0,71	0,44	5,31	5,22	5,27	0,06	1,21
225	Base N8CMF 11/01	31	31	31	0,00	0,00	1,83	1,89	1,86	0,04	2,28
226	N8CMF_A1	41	41	41	0,00	0,00	1,57	1,64	1,61	0,05	3,08
227	N8CMF_A2	51	51	51	0,00	0,00	2,42	2,19	2,31	0,16	7,04
228	N8CMF_A4	78	80	79	1,41	1,79	3,24	3,34	3,29	0,07	2,15
229	N8CMF_A6	106	106	106	0,00	0,00	3,75	3,90	3,82	0,11	2,78
230	N8CMF_A8	142	142	142	0,00	0,00	5,44	5,54	5,49	0,07	1,29
231	N8CMF_A10	186	184	185	1,41	0,76	6,93	6,79	6,86	0,10	1,44
232	N8CMF_A11	215	223	219	5,66	2,58	8,38	8,66	8,52	0,20	2,32
233	N8CMF_A12	259	258	259	0,71	0,27	9,48	9,67	9,57	0,13	1,40
234	N8CMF_A14	314	321	317	4,95	1,56	11,25	11,32	11,29	0,05	0,44
235	N8CMF_A16	416	401	408	10,61	2,60	15,09	15,56	15,32	0,33	2,17
236	N8CMF_A18	607	634	621	19,09	3,07	18,99	19,25	19,12	0,18	0,96
237	N8CMF_9068 08:00	152	147	149	3,54	2,37	5,65	5,50	5,58	0,11	1,90
238	N8CMF_9101 05:54	152	152	152	0,00	0,00	5,63	5,77	5,70	0,10	1,74
239	N8CMF_9127 04:41	155	154	155	0,71	0,46	5,51	5,35	5,43	0,11	2,08
240	N8CMF_9211 15:35	158	157	158	0,71	0,45	5,20	4,85	5,03	0,25	4,92
241	N8CMF_9305 15:58	157	156	157	0,71	0,45	5,90	5,85	5,87	0,04	0,60
242	N8CMF_9349 02:24	152	151	152	0,71	0,47	4,81	4,98	4,89	0,12	2,46
243	N8CMF_0032 06:07	150	152	151	0,93	0,61	5,34	5,27	5,30	0,05	0,93
244	N8CMF_0033 04:55	154	153	154	0,71	0,46	5,44	5,12	5,28	0,23	4,29
245	N8CMF_0101 15:19	142	142	142	0,11	0,08	6,26	6,32	6,29	0,04	0,67
246	N8CMF_0120 21:48	155	157	156	1,41	0,91	5,52	5,51	5,52	0,01	0,13
247	N8CMF_0121 04:41	155	157	156	1,41	0,91	5,83	5,86	5,84	0,02	0,36
248	N8CMF_0145 02:05	150	150	150	0,00	0,00	5,26	5,29	5,28	0,02	0,40
249	N8CMF_0173 23:10	154	152	153	1,41	0,92	5,29	5,39	5,34	0,07	1,32
250	N8CMF_0174 01:18	153	151	152	1,41	0,93	5,62	5,52	5,57	0,07	1,27
251	N8CMF_0174 10:40	146	144	145	1,41	0,98	5,24	5,51	5,37	0,19	3,56
252	N8CMF_0201 12:46	153	152	153	0,71	0,46	5,22	5,29	5,26	0,05	0,94
253	N8CMF_0276 21:34	162	160	161	1,41	0,88	5,13	5,25	5,19	0,08	1,63
254	N8CMF_0336 07:36	156	155	156	0,71	0,45	5,51	5,63	5,57	0,08	1,52

Tabela 71 - Resultados de referência para o Grupo 3, obtidos por Absorção Atômica

Número	Código da Amostra	CÁLCIO					FERRO				
		Replicado 1	Replicado 2	Média	SD (r)	RSD (r)	Replicado 1	Replicado 2	Média	SD (r)	RSD (r)
255	N8CC_A1	39	38	38	0,71	1,81	2,34	2,33	2,34	0,01	0,30
256	N8CC_A2	60	60	60	0,00	0,00	2,95	3,02	2,98	0,05	1,66
257	N8CC_A4	99	91	95	5,85	6,16	4,32	4,51	4,43	0,13	3,03
258	N8CC_A6	140	144	142	2,83	1,99	5,50	5,68	5,59	0,13	2,28
259	N8CC_A8	201	197	199	2,83	1,42	6,95	6,70	6,83	0,18	2,59
260	N8CC_A10	284	287	286	2,12	0,74	8,61	8,71	8,66	0,07	0,82
261	N8CC_A11	382	386	384	2,83	0,74	10,59	10,68	10,64	0,06	0,60
262	N8CC_A12	412	421	416	6,36	1,53	12,94	12,87	12,90	0,05	0,38
263	N8CC_A14	595	600	598	3,54	0,59	16,53	16,99	16,76	0,33	1,94
264	N8CC_A16	991	1019	1005	19,80	1,97	34,42	32,94	33,68	1,05	3,11
265	N8CC_A1_21/03	38	37	38	0,71	1,86	3,30	3,28	3,29	0,01	0,43
266	N8CC_A2_21/03	91	90	91	0,71	0,78	4,57	4,58	4,58	0,01	0,15
267	N8CC_A3_21/03	110	110	110	0,00	0,00	4,90	4,80	4,85	0,07	1,46
268	N8CC_A4_21/03	128	128	129	0,00	0,00	5,30	5,31	5,31	0,01	0,13
269	N8CC_A5_21/03	150	148	149	1,41	0,95	5,91	5,92	5,92	0,01	0,12
270	N8CC_A6_21/03	172	169	171	2,12	1,24	6,52	6,72	6,62	0,14	2,14
271	N8CC_A7_21/03	185	188	186	2,12	1,14	6,93	7,24	7,09	0,22	3,09
272	N8CC_A8_21/03	201	200	201	0,71	0,35	7,75	7,72	7,73	0,02	0,27
273	N8CC_A9_21/03	213	213	213	0,00	0,00	8,08	8,05	8,06	0,02	0,26
274	N8CC_A10_21/03	219	222	220	2,12	0,96	8,58	8,46	8,52	0,08	1,00
275	N8CC_A11_21/03	224	223	224	0,71	0,32	8,64	8,65	8,65	0,01	0,08
276	N8CC_A12_21/03	229	231	230	1,41	0,61	8,70	8,79	8,75	0,06	0,73
277	N8CC_A13_21/03	246	244	245	1,41	0,58	9,22	8,96	9,09	0,18	2,02
278	N8CC_A14_21/03	277	276	277	0,71	0,26	9,15	9,40	9,28	0,18	1,90
279	N8CC_A15_21/03	279	283	281	2,83	1,01	9,42	9,53	9,48	0,08	0,82
280	N8CC_A16_21/03	296	295	296	0,71	0,24	10,10	9,72	9,91	0,27	2,71
281	N8CC_A17_21/03	318	312	315	4,24	1,35	10,68	10,61	10,65	0,05	0,46
282	N8CC_A18_21/03	348	336	342	8,49	2,48	11,69	11,33	11,51	0,25	2,21
283	N8CC_A19_21/03	378	380	379	1,41	0,37	12,39	12,65	12,52	0,18	1,47
284	N8CC_A20_21/03	447	443	445	2,83	0,64	14,21	13,90	14,05	0,22	1,56
285	N8CC_9054 14:22	188	190	189	1,41	0,75	7,05	6,88	6,97	0,12	1,72
286	N8CC_9055 03:06	202	202	202	0,00	0,00	6,17	5,97	6,07	0,14	2,33
287	N8CC_9087 16:10	190	188	189	1,41	0,75	5,24	5,52	5,38	0,20	3,68
288	N8CC_9119 08:51	209	205	207	2,83	1,37	5,82	5,68	5,75	0,10	1,72
289	N8CC_9120 05:01	206	206	206	0,00	0,00	6,31	6,08	6,20	0,16	2,62
290	N8CC_9138 23:04	191	193	192	1,41	0,74	6,08	6,13	6,10	0,04	0,58
291	N8CC_9138 23:34	189	188	189	0,71	0,38	5,96	6,01	5,99	0,04	0,59
292	N8CC_9188 05:54	200	202	201	1,41	0,70	6,57	6,69	6,63	0,08	1,28
293	N8CC_9189 13:12	216	218	217	1,41	0,65	6,45	6,64	6,55	0,13	2,05
294	N8CC_9189_13:21						6,37	6,29	6,33	0,06	0,89
295	N8CC_9325 23:02	211	200	205	7,78	3,79	8,22	8,10	8,16	0,08	1,04
296	N8CC_9326 04:12	199	202	200	2,12	1,06	6,57	6,51	6,54	0,04	0,65

297	N8CC_9327	203	198	201	3,54	1,76	6,20	6,13	6,16	0,05	0,80
298	N8CC_9327 02:47	211	210	211	0,71	0,34	5,41	5,44	5,42	0,02	0,39
299	N8CC_9330 06:35	229	229	229	0,00	0,00	4,87	4,79	4,83	0,06	1,17
300	N8CC_9330 22:15	197	200	199	2,12	1,07	6,94	6,71	6,85	0,16	2,37
301	N8CC_9331 07:36	202	202	202	0,00	0,00	6,40	6,56	6,48	0,11	1,75
302	N8CC_9332 09:06	201	201	201	0,00	0,00	6,25	6,25	6,25	0,00	0,00
303	N8CC_0026 21:40	198	196	197	1,41	0,72	6,33	6,52	6,43	0,13	2,09
304	N8CC_0029 20:43	199	197	198	1,41	0,71	5,90	5,81	5,86	0,06	1,09
305	N8CC_0030 02:59	195	197	196	1,41	0,72	6,23	6,27	6,25	0,03	0,45
306	N8CC_0089 20:05	203	203	203	0,00	0,00	6,84	6,75	6,79	0,06	0,94
307	N8CC_0090 06:52	212	212	212	0,00	0,00	5,90	6,08	5,99	0,13	2,12
308	N8CC_0091	210	208	209	1,41	0,68	6,56	6,64	6,60	0,06	0,86
309	N8CC_0133 08:32	166	163	165	2,12	1,29	10,60	10,41	10,51	0,13	1,28
310	N8CC_0133 09:41	186	186	186	0,00	0,00	10,45	10,79	10,62	0,24	2,26
311	N8CC_0134 02:25	200	199	199	0,71	0,35	7,77	7,83	7,80	0,04	0,54
312	N8CC_0134 09:44	195	198	197	2,12	1,08	6,90	6,80	6,85	0,07	1,03
313	N8CC_0134 09:53	200	195	198	3,54	1,79					
314	N8CC_0134 12:19	201	205	203	2,83	1,39	7,05	7,52	7,28	0,33	4,57
315	N8CC_0134 16:33	196	194	195	1,41	0,73	7,06	6,99	7,03	0,05	0,70
316	N8CC_0134 20:39	193	193	193	0,00	0,00	6,69	6,79	7,74	0,07	0,91
317	N8CC_0135 13:32	203	202	203	0,71	0,35	6,56	6,68	6,62	0,08	1,28
318	N8CC_0135 15:20	195	202	199	4,95	2,49	6,56	7,02	6,79	0,33	4,79
319	N8CC_0137 01:36	199	199	199	0,00	0,00	7,79	7,99	7,89	0,14	1,79
320	N8CC_0137 04:57	192	190	191	1,41	0,74	6,96	6,96	6,96	0,00	0,00
321	N8CC_0137 09:05	186	183	184	2,12	1,15	5,32	5,00	5,16	0,23	4,39
322	N8CC_0198 04:19	206	205	206	0,71	0,34	6,13	6,24	6,19	0,08	1,26
323	N8CC_0244 12:01	195	194	195	0,71	0,36	6,39	6,30	6,34	0,06	1,00
324	N8CC_0245 22:12	196	194	195	1,41	0,73	6,18	6,21	6,19	0,02	0,34
325	N8CC_0258 22:35	411	409	410	1,41	0,34	9,03	8,48	8,76	0,39	4,44
326	N8CC_0270 08:38	193	194	194	0,71	0,36	6,73	6,61	6,67	0,08	1,27
327	N8CC_0289 21:06	197	195	196	1,41	0,72	6,11	6,05	6,08	0,04	0,70
328	N8CC_0290 12:12	206	206	206	0,00	0,00	6,03	5,92	5,97	0,08	1,30
329	N8CC_0291 13:40	195	191	193	2,83	1,47	5,81	5,86	5,83	0,04	0,61
330	N8CC_0324 01:52	197	195	196	1,41	0,72	6,61	6,73	6,67	0,08	1,27
331	N8CC_0324 02:37	206	203	204	2,12	1,04	7,73	7,65	7,69	0,06	0,74
332	N8CC_0324 04:12	195	196	196	0,71	0,36	7,24	7,29	7,27	0,04	0,49
333	N8CC_0324 04:56	202	203	203	0,71	0,35	7,08	7,12	7,10	0,03	0,40
334	N8CC_0324 06:21	210	213	212	2,12	1,00	4,91	5,01	4,96	0,07	1,43
335	N8CC_0324 07:14	210	209	210	0,71	0,34	4,13	4,05	4,09	0,06	1,38
336	N8CC_0324 07:45	203	201	202	1,41	0,70	3,40	3,47	3,43	0,05	1,44
337	N8CC_0324 08:00	200	203	202	2,12	1,05	3,20	3,29	3,25	0,06	1,96
338	N8CC_0324 08:15	206	195	201	7,78	3,87	3,20	3,09	3,15	0,08	2,47
339	N8CC_0324 08:36	210	213	212	2,12	1,00	3,51	3,56	3,54	0,04	1,00
340	N8CC_0324 08:48	203	203	203	0,00	0,00	3,26	3,23	3,24	0,02	0,65
341	N8CC_0324 09:23	193	190	191	2,12	1,11	3,37	3,37	3,37	0,00	0,00
342	N8CC_0345 21:37	189	195	197	4,24	2,15	7,25	7,21	7,23	0,03	0,39
343	N8CC_0345 22:45	199	200	199	0,71	0,35	7,36	7,27	7,31	0,06	0,87
344	N8CC_0346 00:47	203	200	202	2,12	1,05	7,52	7,71	7,62	0,13	1,76

345	N8CC_0346 02:14	196	194	195	1,41	0,73	6,86	6,52	6,69	0,24	3,59
346	N8CC_0346 08:59	192	187	189	3,54	1,87	7,52	7,47	7,49	0,04	0,47
347	N8CC_0346 13:49	193	191	192	1,41	0,74	7,74	7,92	7,83	0,13	1,63
348	N8CC_0346 20:36	199	199	199	0,00	0,00	8,28	8,18	8,23	0,07	0,86
349	N8CC_0346 22:56	204	202	203	1,41	0,70	7,98	8,03	8,00	0,04	0,44
350	N8CC_1059 BB26	209	207	208	1,41	0,68	7,86	7,60	7,73	0,18	2,38
351	N8CC_1060 BB32	198	197	198	0,71	0,36	8,31	8,31	8,31	0,00	0,00
352	N8CC_1061 02:07	191	197	194	4,24	2,19	7,72	7,82	7,81	0,07	0,91
353	N8CC_1061 05:26	195	191	193	2,83	1,47	7,72	8,03	7,88	0,22	2,78
354	N8CC_1061 06:16	194	194	194	0,00	0,00	8,13	7,95	8,04	0,13	1,58
355	N8CC_1061 07:27	196	196	196	0,00	0,00	8,16	8,67	8,42	0,36	4,28
356	N8CC_1061 09:19	195	192	193	2,12	1,10	8,00	8,07	8,04	0,05	0,62
357	N8CC_1061 15:53	194	197	195	2,12	1,09	7,64	7,32	7,48	0,23	3,03
358	N8CC_1061 19:47	202	209	205	4,95	2,41	7,96	7,87	7,91	0,06	0,80
359	N8CC_1061 23:24	196	194	195	1,41	0,73	7,30	7,42	7,36	0,08	1,15
360	N8CC_1062 00:40	196	197	197	0,71	0,36	7,35	7,36	7,36	0,01	0,10
361	N8CC_1062 01:24	197	197	197	0,00	0,00	6,82	7,16	6,99	0,24	3,44
362	N8CC_1062 04:10	196	195	196	0,71	0,36	7,53	7,70	7,61	0,12	1,58
363	N8CC_1062 04:58	197	196	197	0,71	0,36	7,42	7,61	7,52	0,13	1,79
364	N8CC_1062 05:15	196	197	197	0,71	0,36	7,79	7,83	7,81	0,03	0,36
365	N8CC_1062 07:26	195	195	195	0,00	0,00	7,98	7,97	7,98	0,01	0,09
366	N8CC_1062 07:40	195	194	195	0,71	0,36	7,55	7,75	7,65	0,14	1,85
367	N8CC_1062 08:11	197	194	196	2,12	1,08	7,74	7,70	7,72	0,03	0,37
368	N8CC_1062 09:53	193	194	194	0,71	0,36	7,52	7,80	7,66	0,20	2,58
369	N8CC_1062 11:20	195	193	194	1,41	0,73	7,29	7,43	7,36	0,10	1,35
370	N8CC_1062 13:03	177	178	177	0,71	0,40	6,88	6,94	6,91	0,04	0,61
371	N8CC_1062 13:17	185	185	185	0,00	0,00	7,11	7,15	7,13	0,03	0,40

*Tabela 72 - Média do desvio padrão e do Desvio padrão relativo das amostras de referência.*

	Média SD (r)	Média RSD (r) (%)
<i>Modelo 1, Ferro</i>	0,22	2,74
<i>Modelo 1, Cálcio</i>	2,81	0,67
<i>Modelo 2, Ferro</i>	0,13	2,25
<i>Modelo 2, Cálcio</i>	2,04	0,92
<i>Modelo 3, Ferro</i>	0,11	1,41
<i>Modelo 3, Cálcio</i>	1,83	0,84

